



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – CCB  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**MURYEL DE CARVALHO GONÇALVES**

**SÍNDROME DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCALIZADA  
DURANTE A SEPSE INDUZIDA POR PNEUMONIA:  
PERFIL DA AVALIAÇÃO CLÍNICA, BACTERIANA E  
INFLAMATÓRIA**

**Florianópolis  
2015**



Muryel de Carvalho Gonçalves

**SÍNDROME DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCALIZADA  
DURANTE A SEPSE INDUZIDA POR PNEUMONIA:  
PERFIL DA AVALIAÇÃO CLÍNICA, BACTERIANA E  
INFLAMATÓRIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

Florianópolis  
2015



Muryel de Carvalho Gonçalves

**SÍNDROME DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCALIZADA  
DURANTE A SEPSE INDUZIDA POR PNEUMONIA:  
PERFIL DA AVALIAÇÃO CLÍNICA, BACTERIANA E  
INFLAMATÓRIA**

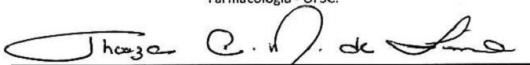
Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de Doutora em Farmacologia e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

"Síndrome da resposta inflamatória localizada durante a sepse induzida por pneumonia: perfil da avaliação clínica, bacteriana e inflamatória"

Por

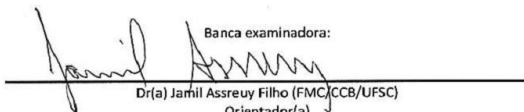
Muryel de Carvalho Gonçalves

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (030/PPGFMC/2015) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.

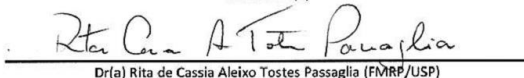


Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro de Lima  
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Banca examinadora:



Dr(a) Jarhil Assreuy Filho (FMC/CCB/UFSC)  
Orientador(a)



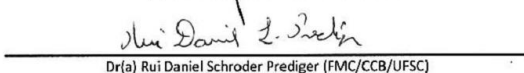
Dr(a) Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia (FMRP/USP)



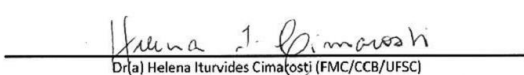
Dr(a) José Carlos Farias Alves Filho (FMRP/USP)



Dr(a) Giles Alexander Rae (FMC/CCB/UFSC)



Dr(a) Rui Daniel Schroder Prediger (FMC/CCB/UFSC)



Dr(a) Helena Iturvides Cimatosti (FMC/CCB/UFSC)

Florianópolis, 23 de setembro de 2015.



## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Jamil Assreuy, por todos estes anos de aprendizado científico e pessoal, pelo carinho, atenção e preocupação. Agradeço muito à sua paciência e confiança.

Aos professores Rui Prediger, Adair Soares dos Santos, Áurea Elizabeth Linder e à Gerusa Dalmolin por examinarem o texto e a apresentação da qualificação de doutorado. Obrigada pela manhã agradável de discussão científica e aprendizado.

Aos professores Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia, José Carlos Farias Alves Filho, Giles Alexander Rae, Rui Prediger, Helena Iturvides Cimarosti e Daniela Dal-Secco por aceitarem compor a banca de avaliação deste doutorado.

Aos colaboradores deste trabalho, Verônica Howewicz, Débora Luckemeyer e Arthur Prudente, por toda a dedicação, parceria e bom humor durante os longos experimentos.

Em especial, à Verônica Horewicz, por toda a ajuda na parte teórica e prática deste estudo, pela amizade, pela alegria e bom humor, e também por me apoiar em momentos muito difíceis. V, você é demais!

Ao meu marido, familiares e amigos, pelo apoio incondicional deste trabalho e pelo incentivo constante.

À Adriane Madeira, pelo carinho, conversas e organização de todo o laboratório. Ao Edir Rezende, Gustavo Ramos e Elisabete Regina Bof, pela amizade, e aos demais membros do NOLAB, pelos anos de convivência e aprendizado.

Aos funcionários do Lameb I pela ajuda para a realização de experimentos ao longo desses anos.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, em especial ao Pedro Paulo de Souza do Biotério Setorial.

Agradeço também às secretárias Sheila Delfino de Souza, da Secretaria da Farmacologia, e Rebeca Andrade da Secretaria Integrada de Pós-graduação do CCB/UFSC, por serem muito gentis e solícitas em vários momentos durante o meu doutorado.

À Capes, ao CNPq, à FAPESC e ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da UFSC, pelo apoio financeiro.





### ***Contranarciso***

*em mim  
eu vejo o outro  
e outro  
e outro  
enfim dezenas  
trens passando  
vagões cheios de gente  
centenas*

*o outro  
que há em mim  
é você  
você  
e você  
assim como*

*eu estou em você  
eu estou nele  
em nós  
e só quando  
estamos em nós  
estamos em paz  
mesmo que estejamos a sós*

*...*

**Paulo Leminski**



## RESUMO

A sepse induzida por pneumonia é responsável por cerca de 50% dos casos de pneumonia no mundo. A bactéria gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* é uma das bactérias mais comuns na sepse nosocomial e contribui para a alta taxa de mortalidade desta condição. Os pacientes que evoluem para sepse grave e choque séptico apresentam disfunção de órgãos e níveis elevados de citocinas plasmáticas, as quais podem ser responsáveis pela morte de muitos pacientes. Uma forma de se avaliar o quadro dos pacientes sépticos e prever como será a progressão desta síndrome é por meio dos escores clínicos, sendo assim, o objetivo deste estudo foi verificar a aplicabilidade de escore clínico murino e correlacioná-lo com a mortalidade e disseminação bacteriana em diferentes órgãos, como também avaliar a produção de citocinas nestes órgãos, além dos níveis plasmáticos. O modelo utilizado no estudo foi a sepse induzida por pneumonia em camundongos machos. A indução da sepse foi realizada por meio da inoculação intratraqueal de *Klebsiella pneumoniae*  $1 \times 10^9$  CFU/animal. A avaliação de escore clínico foi realizada ao longo do tempo e em todos os experimentos. Os resultados mostraram que animais que apresentam escores clínicos mais elevados ( $> 3$ ) possuem maior probabilidade de morrerem. Animais com escore  $> 3$  têm bacteremia transitória, porém, mostram disseminação para diferentes órgãos como coração, rim, fígado e cérebro, a partir de 2 horas após a inoculação da bactéria. A disseminação apresentou-se ainda maior 6 e 24 horas após a infecção. Observou-se também que animais com escores  $> 3$  demonstram mais do que 3 tecidos infectados, ou seja, quanto mais órgãos afetados, maior o escore clínico e, conseqüentemente, maior o risco de morte. Além disso, nestes mesmos animais que apresentaram alta disseminação bacteriana e escores altos, mensurou-se o nível de 4 citocinas (TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-6 e IL-10), tanto no plasma e foco infeccioso (pulmão), quanto no coração, fígado, rim e cérebro. As citocinas também começaram a se elevar a partir de 2 horas em diferentes tecidos, mantendo-se altas até 24 horas. Os níveis de ureia, creatinina, alanina transferase e aspartato transferase aumentaram significativamente, principalmente 24 horas após a infecção. Diante do exposto, os

dados deste trabalho sugerem que: i) escores de gravidade têm poder preditivo em modelos experimentais de sepse e ii) altas concentrações de citocinas teciduais podem contribuir para inflamação localizada e ser um dos fatores responsáveis pelo dano de órgãos.

**Palavras-chave:** Sepse. *Klebsiella pneumoniae*. Escore clínico. Disseminação bacteriana. Citocinas.

## ABSTRACT

The pneumonia-induced sepsis is responsible for about 50% of cases in the world. The gram-negative bacterium *Klebsiella pneumoniae* is one of the most common bacteria involved in nosocomial sepsis and contributes to the high mortality rate. Patients who develop severe sepsis and septic shock present organ dysfunction and elevated plasma cytokine levels which may lead to the death of many of them. Clinical scores are observations to evaluate the framework of septic patients. They can predict the syndrome progress and also the mortality. Therefore, the objective of our study was to verify the applicability of a murine clinical score system and to correlate it with mortality and bacterial dissemination in different organs. In addition, to evaluate cytokines production from these organs which present high bacterial load. The model used in our experiments was pneumonia-induced sepsis in male mice. The induction was performed by *Klebsiella pneumoniae* inoculation of  $1 \times 10^9$  UFC/animal intratracheally. The clinical score evaluation was performed over time in all experiments. The results demonstrated animals which present higher clinical scores ( $> 3$ ) are more likely to die. Animals presenting clinical scores  $> 3$  presented transient bacteremia, however, displayed bacterial spreading to different organs as heart, kidney, liver, and brain. The bacterial dissemination starts at 2 hours after the bacterial inoculation. The spreading was even higher 6 and 24 hours after infection. It was also observed that animals with scores above 3 present more than 3 infected tissues by *K. pneumoniae*. There is a correlation between clinical scores and bacterial dissemination, as many more organs are infected, major clinical scores will be showed and consequently the greatest risk of death. In addition, animals which showed bacterial dissemination in more than three organs and high clinical scores ( $> 3$ ) present high levels of 4 cytokines (TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-6 and IL-10), at plasma and focus of infection (lung), as well as heart, liver, kidney and brain. The cytokines also started to rise 2 hours after infection in different tissues and remained high until 24 hours. Tissue cytokine concentrations might contribute to the organ damage of pneumoseptic animals. The levels of urea, creatinine, and aspartate transaminase and alanine transferase increased

significantly, especially 24 hours after infection. Therefore, this study data suggest that: i) severity scores have predictive power in experimental models of sepsis and ii) high concentrations of tissue cytokines may contribute to localized inflammation and be one of the factors responsible for the loss of function and organ damage.

**Keywords:** Sepsis. *Klebsiella pneumonia*. Clinical scores. Bacterial dissemination. Cytokines.

## **LISTA DE ESQUEMAS E QUADROS**

Esquema 1 - Relação entre SIRS, sepse, sepse severa e choque séptico .....	22
Esquema 2 - Fluxograma do desenho experimental do estudo .	40
Quadro 1 - Os critérios de diagnóstico de sepse.....	24
Quadro 2 - Critérios de diagnóstico de sepse grave .....	25
Quadro 3 - Escores clínicos .....	43





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ativação do sistema imune após lesões não-infecciosa e após infecções .....	31
Figura 2 - Curvas de característica de operação do receptor (ROC) .....	46
Figura 3 - Curva de sobrevivência de camundongos infectados com <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	50
Figura 4 - Escores clínicos e curva característica de operação do receptor (ROC) .....	51
Figura 5 - Curso temporal da disseminação bacteriana em diferentes órgãos de camundongos inoculados com <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	53
Figura 6 - Relação entre disseminação bacteriana e escores clínicos .....	55
Figura 7 - Avaliação dos níveis plasmáticos e tissulares de TNF- $\alpha$ de animais sépticos e controles .....	58
Figura 8 - Avaliação dos níveis plasmáticos e tissulares de MCP-1 de animais sépticos e controles .....	59
Figura 9 - Avaliação dos níveis plasmáticos e tissulares de IL-10 de animais sépticos e controles .....	60
Figura 10 - Avaliação dos níveis plasmáticos e tissulares de IL-6 de animais sépticos e controles .....	61
Figura 11 - Marcadores de dano de órgãos em animais inoculados com <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	63
Figura 12 - Contagem de leucócitos e plaquetas de animais com pneumosepse e falso-inoculados .....	64
Figura 13 - Avaliação da glicemia de animais com pneumosepse .....	65



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AUC</b>	Área sob a curva
<b>Bpm</b>	Batimentos por minuto
<b>CLP</b>	Ligadura e perfuração do ceco
<b>DAMP</b>	Padrão molecular associado ao dano
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>HMGB1</b>	Proteína do grupo de alta mobilidade com domínio box 1
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>i.t.</b>	Intratraqueal
<b>i.v.</b>	Intravenoso
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon-gama
<b>IKK</b>	Complexo inibitório I $\kappa$ B
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IRAK</b>	Cinase associada ao receptor de IL-1
<b>JNK</b>	Cinase c-Jun N-terminal
<b>LBP</b>	Proteína ligadora de LPS
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MAPK</b>	Proteína cinase ativada por mitógeno
<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotática de monócito-1
<b>MIF</b>	Fator inibitório de migração de neutrófilos
<b>MyD88</b>	Proteína de diferenciação mielóide 88
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
<b>NET</b>	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Fator nuclear kappa B
<b>PAMP</b>	Padrão molecular associado a patógenos
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salina
<b>PCR</b>	Proteína C reativa
<b>ROC</b>	Características de operação do receptor
<b>SAPS III</b>	Simplified acute physiology score III
<b>SCCM</b>	Sociedade de medicina intensiva

<b>SDMO</b>	Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos
<b>SIRS</b>	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
<b>SOFA</b>	Avaliação de falência de órgãos sequencial
<b>TIR</b>	Domínio de homologia do receptor <i>Toll</i> /IL-1
<b>TIRAP</b>	Proteína adaptadora contendo o domínio TIR
<b>TLR</b>	Receptor tipo <i>Toll</i>
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>TRAF6</b>	Fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral
<b>CFU</b>	Unidades formadoras de colônias
<b>UTI</b>	Unidade de terapia intensiva

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
1.1	SEPSE: CONCEITO E EPIDEMIOLOGIA .....	21
1.2	ETIOLOGIA .....	27
1.3	PATOGÊNESE DA SEPSE .....	28
1.4	CITOCINAS NA SEPSE .....	31
1.5	DISFUNÇÃO DE ÓRGÃOS NA SEPSE .....	35
<b>1.5.1</b>	<b>Escores clínicos .....</b>	<b>36</b>
1.6	HIPÓTESES DO TRABALHO .....	38
1.7	OBJETIVOS.....	38
<b>1.7.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>38</b>
<b>1.7.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>38</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
2.1	ANIMAIS .....	39
2.2	DESENHO EXPERIMENTAL .....	39
2.3	SEPSE INDUZIDA POR PNEUMONIA.....	40
<b>2.3.1</b>	<b>Aumento da patogenicidade e expansão da bactéria .....</b>	<b>40</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Quantificação do número de bactérias.....</b>	<b>42</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Inoculação de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em camundongos .....</b>	<b>42</b>
2.4	QUANTIFICAÇÃO DA DISSEMINAÇÃO BACTERIANA..	43
2.5	ESCORE CLÍNICO.....	43
2.6	MENSURAÇÃO DE CITOCINAS .....	44
2.7	ENSAIOS BIOQUÍMICOS E CONTAGEM DE CÉLULAS	44
2.8	AVALIAÇÃO DA GLICEMIA .....	45
2.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	45
<b>3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
3.1	SOBREVIDA APÓS A INOCULAÇÃO DE <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> .....	49
3.2	ESCALA DE ESCORES CLÍNICOS OBSERVADO DURANTE A PNEUMOSEPSE .....	50
3.3	CURSO TEMPORAL DA DISSEMINAÇÃO BACTERIANA.....	52
3.4	CITOCINAS PLASMÁTICAS E TISSULARES.....	56

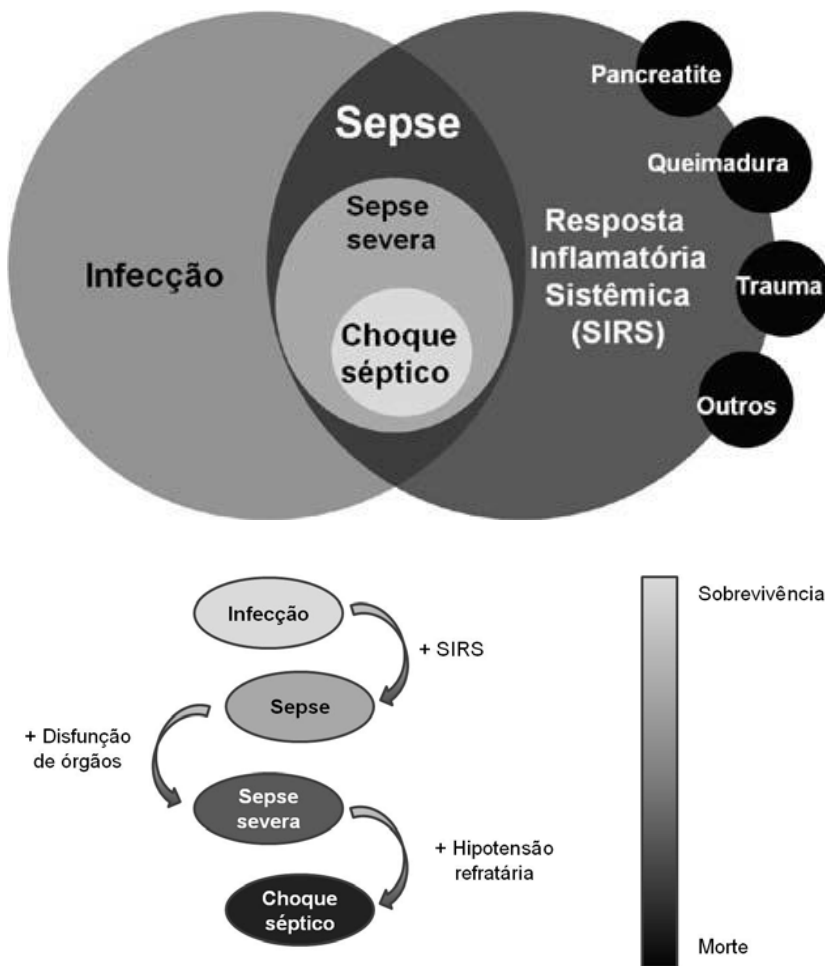
3.5	MARCADORES DE DANO DE ÓRGÃOS .....	62
3.6	CONTAGEM DE LEUCÓCITOS E PLAQUETAS.....	63
3.7	GLICEMIA .....	64
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>87</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>89</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 SEPSE: CONCEITO E EPIDEMIOLOGIA

A sepse é uma síndrome clínica grave e sistêmica que abrange sinais e sintomas, desencadeada por um microrganismo invasor (bactérias, fungos, vírus etc.). A sepse é caracterizada por uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) associada a uma infecção. A SIRS é definida como a resposta do organismo a uma lesão (trauma, pancreatite, queimaduras), na qual respostas imunológicas pró e anti-inflamatórias são manifestadas (BONE et al., 1992; revisado por LEVY et al., 2003). Assim, a SIRS em humanos foi definida em 1992, durante reunião de consenso da *American College of Chest Physicians* e da *Society of Critical Care Medicine* (ACCP/SCCM). A SIRS é positiva quando dois ou mais dos seguintes sintomas clínicos são diagnosticados: temperatura corporal  $> 38^{\circ}\text{C}$  ou  $< 36^{\circ}\text{C}$ ; frequência cardíaca  $> 90$  bpm; frequência respiratória  $> 20$  movimentos/minuto; leucometria  $> 12.000/\text{mm}^3$  ou  $< 4.000/\text{mm}^3$  ou ainda, presença de mais de 10% de bastonetes (BONE et al., 1992).

Quando a SIRS ocorre secundariamente a um processo infeccioso é denominada sepse e, se apresentar falência de um ou mais órgãos, é classificada como sepse severa. Se houver o desenvolvimento de hipotensão severa refratária a agentes vasoconstritores ou à reposição volêmica, pode se diagnosticar o choque séptico (Esquema 1) (BONE et al., 2002; 2009).



**Esquema 1 - Relação entre SIRS, sepse, sepse severa e choque séptico.** A SIRS associada a infecção é definida como sepse, a qual pode evoluir para sepse severa e choque séptico. Fonte: Adaptado de Bone et al. (2002) e revisado por Chiche et al. (2011).



Nos últimos 30 anos, a nomenclatura relacionada à sepse não foi alterada e ainda há discussão sobre melhores opções para se obter o diagnóstico precoce e aumentar as chances de sobrevivência dos pacientes. O conceito de SIRS, por exemplo, tem sido criticado, pois alguns dos sinais e sintomas coincidem com infecções virais e outras doenças (VINCENT et al., 1997; VINCENT et al., 2013). Kaukonen e colaboradores (2014) apresentaram dados interessantes sobre um estudo retrospectivo realizado na Austrália e Nova Zelândia, com mais de um milhão de pacientes durante o período de 14 anos. Dentre os pacientes avaliados, cerca de 100 mil apresentaram infecção e disfunção de órgãos. Destes, cerca de 88% evoluíram para sepse grave e apresentaram dois ou mais critérios de SIRS, ou seja, eram SIRS positivos. Entretanto, cerca de 12% dos pacientes com sepse grave não preencheram os critérios da SIRS e, por esta razão, foram considerados SIRS negativos. A necessidade de dois ou mais sinais e sintomas da SIRS pode excluir 1 a cada 8 pacientes com sepse, mesmo este paciente apresentando infecção, disfunção orgânica e risco de morte. Apesar do termo SIRS ainda ser bastante utilizado em vários trabalhos científicos, nas últimas atualizações da Campanha Sobrevivendo à Sepse, o termo SIRS não tem sido mais utilizado (DELLINGER et al., 2008; DELLINGER et al., 2013). O Quadro 1, a seguir, apresenta todas as variáveis contempladas no diagnóstico da sepse (SCHORR et al., 2014). O Quadro 2 apresenta as informações clínicas a respeito da sepse grave (LEVY et al., 2003; DELLINGER et al., 2013). Adicionalmente, o choque séptico ainda apresenta outra manifestação clínica, a hipotensão refratária à reposição fluida ou à administração de vasoconstritores (DELLINGER et al., 2013).

Apesar das informações atualizadas a respeito do uso da terminologia/conceito da SIRS, várias pesquisas recém-finalizadas ou em andamento ainda utilizam este termo com frequência.

Quadro 1 - Os critérios de diagnóstico de sepse

<b>Sinais de infecção comprovada ou suspeita de infecção</b>	
<b>Variáveis gerais</b>	<b>Variáveis hemodinâmicas</b>
Febre > 38,3°C	Hipotensão arterial (PAS < 90 mmHg ou MAP < 70 mmHg)
Hipotermia (temperatura interna < 36°C)	PAS > 40 mmHg em adultos ou inferior a 2 DP abaixo do normal para a idade
Frequência cardíaca > 90/min.	<b>Variáveis disfunção orgânica</b>
Taquipneia	Hipoxemia arterial ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$ )
Estado mental alterado	Oligúria (débito urinário < 0,5 ml / kg/h durante pelo menos 2 h, apesar da fluidoterapia adequada)
Edema significativo ou balanço hídrico positivo (> 20 mL/Kg ao longo de 24 h)	Aumento da creatinina > 0,5 mg/dL ou 44,2 mmol/L
Hiperglicemia (glicose no plasma > 140 mg/dL)	Alterações da coagulação (INR > 1,5 ou TTPa > 60 s)
<b>Variáveis inflamatórias</b>	Íleo (som de intestino ausente)
Leucocitose (leucócitos > 12 000 mL <sup>-1</sup> )	Trombocitopenia (contagem de plaquetas < 100 000/mL)
Leucopenia (leucócitos < 4000 mL <sup>-1</sup> )	Hiperbilirrubinemia (plasma de bilirrubina total > 4 mg/dL ou 70 µmol/L)
Contagem de glóbulos brancos normal, com mais de 10% de formas imaturas	<b>Variáveis de perfusão tecidual</b>
Proteína C-reactiva plasmática > 2 DP acima do valor normal	Hiperlactatemia (> 1 mmol/L)
Procalcitonina plasmática > 2 DP acima do valor normal	Diminuição de enchimento capilar ou manchas

DP: desvio-padrão, PAS: pressão arterial sistólica, MAP: pressão arterial média, PaCO<sub>2</sub>: pressão parcial de CO<sub>2</sub>, FiO<sub>2</sub>: fração inspirada de O<sub>2</sub>, INR: razão normalizada internacional, TTPa: tempo de tromboplastina parcial ativada. Fonte: Adaptado de Schorr et al. (2014).

Quadro 2 - Critérios de diagnóstico de sepse grave

<b>Definição sepse grave Hipoperfusão ou disfunção de órgãos (qualquer um dos seguintes, provavelmente devido à infecção)</b>
Hipotensão induzida por sepse
Lactato acima dos limites superiores normais
A produção de urina < 0,5 ml/kg/h durante mais de 2 horas apesar da ressuscitação adequada de líquidos (reposição volêmica)
Lesão pulmonar aguda com $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 250$ na ausência de pneumonia como fonte de infecção
Lesão pulmonar aguda com $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200$ na presença de pneumonia fonte de infecção
Creatinina > 2,0 mg/dL (176,8 $\mu\text{mol/L}$ )
Bilirrubina > 2 mg/dL (34,2 $\mu\text{mol/L}$ )
Contagem de plaquetas < 100 000/ $\mu\text{L}$
Coagulopatia (RNI > 1,5)

$\text{PaCO}_2$ : pressão parcial de  $\text{CO}_2$ ,  $\text{FiO}_2$ : fração inspirada de  $\text{O}_2$ , INR: razão normalizada internacional. Fonte: Adaptado de Levy et al. (2003) e Dellinger et al. (2013).

Os sinais e sintomas da sepse são comuns a várias outras doenças. Por esta razão, o seu diagnóstico é deficiente e, muitas vezes, tardio. Alguns pacientes podem evoluir muito rapidamente para o choque séptico e morte em poucos dias, dependendo da gravidade da infecção e intensidade da resposta inflamatória (revisado por LEVER; MACKENZIE, 2007; OPAL et al., 2014).

Muitos pacientes que desenvolvem sepse apresentam a imunidade comprometida, e isto pode contribuir com o prognóstico negativo, pois trata-se de uma infecção e inflamação, contra as quais é necessário orquestrar células e sistemas que trabalhem unidos com o objetivo de exterminar a infecção e, consequentemente, a inflamação iniciada. Por esta razão, os pacientes portadores de doenças crônicas possuem prognósticos piores dos que os mais saudáveis. Pacientes soropositivo para o vírus HIV, oncológicos, diabéticos, cardiopatas, insuficientes renais e hepáticos crônicos apresentam maiores taxas de mortalidade, maior tempo de internação e permanência em unidades de terapia intensiva (UTI). Além das comorbidades

comumente observadas na sepse, pacientes afrodescendentes e do sexo masculino formam a população mais atingida pela sepse (revisado por MAYR, 2014).

A sepse pode atingir pessoas de qualquer idade, porém a sua ocorrência é maior em idosos e neonatos. A incidência de sepse neonatal é de 1-8/1.000 nascimentos e apresenta taxa de mortalidade de 16%. Em idosos, acima de 85 anos, a incidência é de 26/1000, com mortalidade de 38,4% (ANGUS et al., 2001; STOLL et al., 2011). A sepse no estágio neonatal geralmente ocorre em prematuros, os quais são imunologicamente comprometidos e mais vulneráveis a infecções e suas consequências, o que resulta em pior prognóstico a curto e longo prazo (DOWNIE et al., 2013). Por razão semelhante, os idosos apresentam imunosenescência e altos níveis de proteínas pró-inflamatórias circulantes (McDONALD et al., 2010).

As taxas de mortalidade por sepse permanecem elevadas no mundo. Em média, a sepse grave contribui com ~40% e o choque séptico com ~60% (revisado por MAYR et al., 2014). No Brasil, a média das taxas de mortalidade são semelhantes. Segundo o BASES (*Brazilian Sepsis Epidemiological Study*), a incidência de sepse, sepse grave e choque séptico é cerca de 62, 36 e 30 casos/1000 pacientes, respectivamente, acolhidos diariamente em UTI no Brasil. As taxas de mortalidade relacionadas à incidência apresentada foram cerca de 35%, 48% e 53%, respectivamente (SILVA et al., 2004). Dados do último Relatório Nacional do Instituto Latino-Americano de Sepse demonstraram que a taxa de mortalidade diferiu entre os hospitais do sistema de saúde público e privado. Cerca de 46% dos pacientes com sepse grave morreram, e cerca 73% dos pacientes com choque séptico não sobreviveram em hospitais públicos. Já em hospitais privados, as taxas foram 23% e 54%, respectivamente (ILAS, 2004). Além de apresentar alta incidência e mortalidade, a sepse apresenta custo anual mínimo de US\$ 8,5 bilhões, representando um problema de saúde pública brasileiro e mundial (SILVA et al., 2004; revisado por TELES et al., 2008).

## 1.2 ETIOLOGIA

A sepse é uma síndrome complexa que abrange diferentes fatores, como o tipo de microrganismo envolvido, o órgão atingido pela infecção, a imunidade do hospedeiro, além de outros já citados anteriormente (comorbidades, idade, gênero, etnia etc.). Em relação à microbiologia dos agentes infecciosos, a sepse pode ser originada a partir de qualquer tipo de microrganismo, principalmente de bactérias, mas também de fungos, de vírus e, menos comumente, a partir de parasitas. As pneumonias contribuem com mais de 50% dos casos de sepse no mundo, sendo as bactérias gram-negativas as maiores causadoras de pneumonia nosocomial, e as gram-positivas prevalecendo na pneumonia comunitária. Os outros 50% dos casos de sepse dividem-se entre as infecções do trato gastrointestinal, trato urinário e pele entre outras (ANGUS; WAX, 2001; ALBERTI et al., 2002; revisado por MAYR et al., 2014).

As principais bactérias que provocam a sepse gram-negativa são as bactérias da família *Enterobacteriaceae*, que inclui a *Escherichia coli* e também do gênero *Klebsiella*. As pneumonias nosocomiais são principalmente causadas por *Klebsiella pneumoniae* (ALBERTI et al., 2002; revisado por TSIOTOU et al., 2005).

A *Klebsiella pneumoniae* é um microrganismo oportunista que é amplamente encontrado na mucosa oral, pele e intestino, assim como em ambientes hospitalares e instrumentos/equipamentos médicos. A infecção causada por este patógeno afeta geralmente pacientes imunologicamente comprometidos. As principais vias de contaminação no ambiente hospitalar são: trato urinário, trato respiratório e sangue. O biofilme de *K. pneumoniae* que se forma ao redor de aparelhos médicos (catéteres e tubos endotraqueais) proporciona significativa fonte de infecção para estes pacientes. Desta forma, existem duas razões pelas quais a bactéria *K. pneumoniae* apresenta altas taxas de mortalidade: uma delas é que este biofilme formado *in vivo* protege o patógeno contra a resposta imunológica do hospedeiro e antibióticos. A outra, é que esta bactéria nosocomial isolada geralmente apresenta fenótipo de resistência a vários fármacos antibióticos (LI et al., 2014).

### 1.3 PATOGÊNESE DA SEPSE

Assim que se inicia uma infecção, células sanguíneas do sistema imune inato, como monócitos, macrófagos, neutrófilos e plaquetas são ativadas e iniciam o processo de defesa do organismo. Os receptores que reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, *Pathogen Associated-Molecular Pattern*, PAMPs) estimulam a fagocitose por macrófagos. Os receptores sinalizadores são responsáveis por disparar a resposta imune e ativar funções celulares, como liberação de citocinas. Os genes que codificam receptores chamados tipo *Toll* (do inglês, *Toll-like Receptors*, TLR) são os reguladores chave da imunidade inata. Geralmente, as respostas do hospedeiro são: febre, secreção de interleucinas, fixação de complemento, ativação de macrófagos e ativação da cascata da coagulação. As citocinas estimuladas pelo TLR levam ao aumento do fator tecidual de macrófagos e monócitos no endotélio e toda a cascata de liberação de outras citocinas envolvidas na SIRS. O fator tecidual estimula a cascata da coagulação e contribui para a coagulação intravascular disseminada, o que ocorre em torno de 30% dos pacientes sépticos. Cerca de 95% dos pacientes sépticos apresentam monômeros e dímeros de fibrina (VOVES et al., 2006).

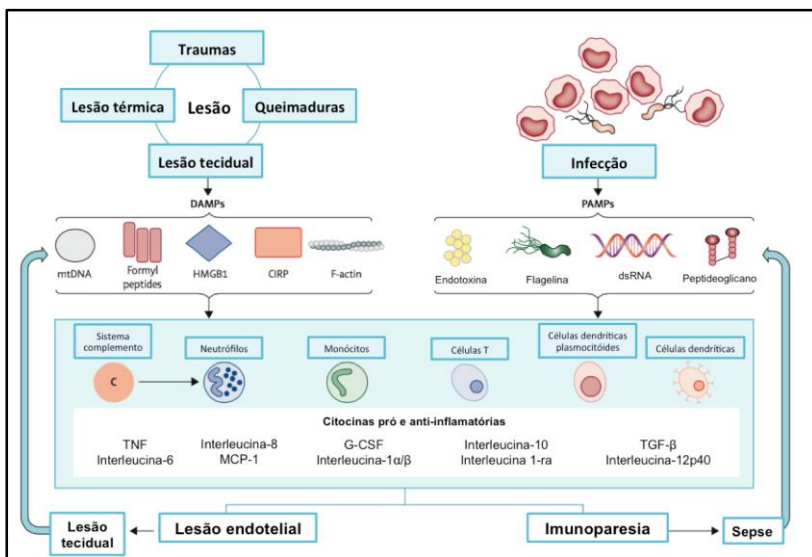
As plaquetas e os neutrófilos são células comumente avaliadas nos exames laboratoriais de pacientes sépticos. Os pacientes com número aumentado ou diminuído de neutrófilos podem ser incluídos no quadro de SIRS e sepse, já a redução do número de plaquetas indica prognóstico ruim ao paciente séptico. Além das plaquetas participarem efetivamente da agregação plaquetária e coagulação, estas células podem formar agregados heterotípicos (BLAIR et al., 2009) com outras células imunes e liberar fatores pró-inflamatórios dos seus grânulos (REX et al., 2009). Esta agregação diferenciada ocorre por meio da ativação dos receptores do tipo *toll* 4 (TLR) das plaquetas, promovendo assim a formação do agregado plaqueta-neutrófilo e liberação de filamentos de DNA coberto por histonas e proteínas antimicrobianas, chamadas de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NET, do inglês *neutrophil extracellular traps*). Essas estruturas se ligam às plaquetas e também às hemácias e formam o trombo, sugerindo, então, outra via de formação de trombo via inflamação (FUCHS et al., 2010).

Um trabalho recente apresentou dados de animais que receberam doses sub-letais de histona e que desenvolveram sinais severos de hemorragia, trombocitopenia e dano tecidual no pulmão após 10 minutos da inoculação (WESTMAN et al., 2014). Um outro estudo, realizado com plasma de pacientes sépticos demonstrou aumento da concentração de histonas (EKANEY et al., 2014). No qual, ensaios *in vivo* e *in vitro* mostraram que as histonas livres atuam diretamente nas células endoteliais e plaquetas, promovendo danos celulares, desequilíbrio hemostático e amplificação da resposta inflamatória por meio da indução da produção de citocinas.

Na sepse, o processo inflamatório é deflagrado pelos PAMPs presentes nos agentes infecciosos. Dentre os PAMPs mais estudados está o lipolissacarídeo (LPS) das bactérias Gram-negativas. A administração de LPS pode ser utilizada como modelo de sepse em animais de experimentação e em seres humanos, e denomina-se endotoxemia. Apesar de não representar a complexidade do quadro séptico, o LPS promove reações agudas e importantes no organismo, como a produção exacerbada de citocinas. O seu principal mecanismo de ação ocorre por meio da ligação com a proteína ligante de LPS (LBP, do inglês, *LPS-Binding Protein*) e do co-receptor CD14, os quais promovem a sinalização por meio do complexo formado com o receptor tipo *Toll* 4 (TLR-4) e a proteína de membrana MD-2 (COHEN et al., 2002). A sinalização intracelular via TLR-4 ocorre por meio da ligação do domínio TIR (do inglês, *Toll/IL-1 Receptor homology domain*) ao IRAK (do inglês, *IL-1 Receptor-Associated Kinase*), um processo facilitado por proteínas adaptadoras, como a MyD88 (do inglês, *Myeloid Differentiation Protein 88*) e TIRAP (do inglês, *TIR domain-containing Adapter Protein*). Posteriormente, ocorre ativação do TRAF6 (do inglês, *Tumor necrosis factor Receptor-associated Factor 6*) que ativa o complexo IKK (cinase I $\kappa$ B), o qual fosforila o inibidor do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), o I $\kappa$ B. A fosforilação do I $\kappa$ B pelo IKK leva à sua degradação por proteossomas, liberando o dímero NF- $\kappa$ B citosólico, que então transloca para o núcleo da célula e regula a transcrição de diversos genes, dentre eles, aqueles que codificam diversas citocinas (COHEN et al., 2002; TANG et al., 2012).

Além dos PAMPs, os DAMPs (do inglês, *Danger-Associated Molecular Patterns*) podem iniciar a resposta inflamatória. A Figura 1 mostra como lesões teciduais podem liberar PAMPs e contribuir para a liberação de diversas moléculas pró-inflamatórias durante o processo inflamatório. Assim, tanto lesões como queimadura e traumas podem liberar DAMPs e ativar células do sistema imune a produzirem citocinas, quanto infecções podem liberar PAMPs de diferentes microrganismos que, por sua vez, também podem ativar células com perfil pró e anti-inflamatório. Exemplos de DAMPs são proteína c-reativa, DNA mitocondrial, actina-F, entre outras moléculas liberadas durante o processo inflamatório. Como exemplos de PAMPs, podemos citar (além do LPS) os peptidoglicanos, flagelinas, RNA de dupla fita etc. (revisado por LORD et al., 2014). Mesmo no contexto da infecção e liberação de PAMPs, pode ocorrer também a liberação de DAMPs no ambiente inflamatório e infeccioso. Deste modo, as moléculas liberadas por células imunes que foram ativadas por DAMPs e PAMPs podem contribuir para a lesão tecidual e início da síndrome séptica em muito paciente e animais de experimentação.





**Figura 1 - Ativação do sistema imune após lesões não-infecciosas e após infecções.** A lesão tecidual leva a liberação extracelular de DAMPs que iniciam a resposta inflamatória na ausência de infecção. A infecção está associada com a exposição do sistema imune aos PAMPs. DAMPs e PAMPs estimulam células do sistema imune e do sistema complemento, os quais contribuem para lesão endotelial, tecidual e imunoparesia. O dano de órgãos e sepse promovem maior liberação de DAMPs e exposição adicional a PAMPs, respectivamente. Desta forma, ocorre um ciclo vicioso com contínua inflamação e ativação do sistema imune. Fonte: Adaptado de Lord et al. (2014).

## 1.4 CITOCINAS NA SEPSE

As citocinas fazem parte de uma família de proteínas com propriedades pró ou anti-inflamatórias e são responsáveis por iniciar e manter o estado inflamatório, incluindo o que ocorre na sepse. A produção das citocinas ocorre em células imunes como neutrófilos, linfócitos, macrófagos, células dendríticas e também outros tipos celulares (STRIZ et al., 2014). Elas são produzidas e liberadas frente a uma lesão tecidual, seja infecciosa ou não, por meio de estímulos celulares como PAMPs e DAMPs. Durante a resposta inflamatória, o número de DAMPs liberados pelas células e encontrados no plasma e nos tecidos é amplo. Os DAMPs (envolvidos na sepse) podem ser representados por restos (*debris*) celulares, DNA (RHODES et al., 2006), alarminas (FOELL et al., 2007), galactinas (TEN OEVER et al., 2013), proteína

HMGB1 (do inglês, *High Mobility group box 1*) (WANG et al., 1999) e histonas (BEAULIEU; FREEDMAN, 2011). Os PAMPs podem ser representados pelo LPS. Receptores que reconhecem DAMPs e PAMPs são ativados e iniciam a cascata de sinalização para amplificar a resposta inflamatória para proteger o organismo (DEUTSCHMAN; TRACEY, 2014).

Na década de 90, acreditava-se que a sepse estava relacionada principalmente com a liberação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucinas (IL-1, IL-6, IL-12), interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e o fator inibitório de migração de neutrófilos (MIF), e foi nesta época que surgiu a expressão "*cytokine storm*" (revisado por AIWAKA, 1996). Pesquisas mais recentes já demonstraram a importância de outras citocinas anti-inflamatórias como IL-10, TGF- $\beta$  e IL-4, as quais restauraram o equilíbrio imunológico (MARCHANT et al., 1994; revisado por COHEN, 2002; SCHULTE et al., 2013).

Indicando sua importância na sepse, o TNF- $\alpha$  foi inicialmente descrito, em 1975 por Carswell e colaboradores, como um fator sérico que causava necrose em tumores em modelo animal de endotoxemia. Dez anos mais tarde, foi verificado que a caquexina, purificada de macrófagos ativados com LPS, era semelhante ao fator sérico ou TNF- $\alpha$  (BEUTLER et al., 1985). Ainda na década de 80, foram descobertas a IL-1, a IL-2, o IFN- $\gamma$  e seus receptores (DINARELLO, 2007).

TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória pleiotrópica produzida principalmente por macrófagos ativados, mas também pode ser induzida em uma variedade de outros tipos celulares. A função primária do TNF- $\alpha$  é a regulação positiva de várias proteínas pró-inflamatórias (quimiocinas, citocinas, moléculas de adesão, fatores de crescimento etc.) por meio da ativação das vias de transcrição do fator NF- $\kappa$ B e MAPK (do inglês, *Mitogen Activated Protein-Kinase*) (PARK et al., 2002). O TNF- $\alpha$  está diretamente relacionado com a caquexia (TRACEY et al., 1987; FUJIWARA et al., 2014), a termorregulação (LEON et al., 1998; LEON et al., 2013), o metabolismo lipídico (PLOMGAARD et al., 2008; LEON et al., 2013), o fluxo de sangue (De SIMONE et al., 2014), a coagulação (NAWROTH; STERN, 1986; BEAULIEU; FREEDMAN, 2011) e a resistência à insulina (IJZERMAN et al., 2006). Os efeitos do TNF- $\alpha$  citados estão presentes na maioria dos pacientes sépticos.

O primeiro trabalho que demonstrou concentrações elevadas de TNF- $\alpha$  em plasma de pacientes sépticos foi realizado em 1986 por Waage e colaboradores. Entretanto, Damas e colaboradores (1989) foram os primeiros a correlacionar o nível plasmático desta citocina com a severidade da sepse. Além disso, doses em nanogramas de TNF- $\alpha$  induzem hipotensão grave e piora do quadro clínico do paciente (DINARELLO, 2011). Outros trabalhos apresentaram dados que apontam o TNF- $\alpha$  como indicador de inflamação/mal prognóstico da sepse (CHACRON-CABRERA et al., 2015; ZHOU et al., 2015). O TNF- $\alpha$  é considerado um bom biomarcador plasmático de sepse para pacientes neonatos, de acordo com estudos de meta-análise (LV et al., 2014a; revisado por DELANGUE; SPEECKAERT, 2015). Outra meta-análise demonstrou que as concentrações de TNF- $\alpha$  em líquor de pacientes com meningite bacteriana são muito superiores às apresentadas por pacientes com meningite não bacteriana (LV et al., 2014b). Além das citocinas, as quimiocinas que são citocinas quimiotáticas também são liberadas na sepse e servem para ampliar a comunicação da inflamação.

A proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1) é uma quimiocina que possui função de atrair células mononucleares, principalmente monócitos/macrófagos, células dendríticas e linfócitos (ROVIN, 2000). Ela foi identificada em 1989 por Yoshimura e colaboradores, em sobrenadante de cultura de linhagens tumorais. Esta quimiocina pode contribuir para a degranulação de mastócitos, levando à proteção de infecções localizadas. O receptor CCR2 e seu ligante, MCP-1, são responsáveis pela migração de monócitos da medula óssea para a periferia durante a infecção bacteriana (SERBINA; PALMER, 2006). Animais com deleção gênica para MCP-1, ou para seu receptor, apresentam aumento de mortalidade durante a infecção por *Listeria monocytogenes* (DELLANO et al., 2011). Um outro estudo mostrou que o tratamento com MCP-1, 24 horas após a indução de sepse promoveu reparo tecidual por indução da fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos (AMANO et al., 2004).

O tratamento com MCP-1 recombinante aumentou a depuração de bactérias e protegeu animais da infecção generalizada dos patógenos *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium*, em uma pesquisa realizada por Nakano e colaboradores (1994). Em 1995, Bossink et al. demonstraram o

aumento de MPC-1 em pacientes com sepse grave e choque séptico, e que os pacientes que sobreviveram a sepse não demonstraram aumento significativo desta quimiocina. Estes trabalhos representam, desta forma, relevante importância do MCP-1 e seu receptor para o processo infeccioso e, conseqüentemente, à sepse. Esta quimiocina pode ser produzida por células mesangiais renais, endoteliais, epiteliais tubulares, musculares lisas e inflamatórias (neutrófilos, fibroblastos) em resposta a estímulos inflamatórios como TNF- $\alpha$  e outras citocinas (revisado por LUSTER, 1998; SICA et al., 1990; SERBINA; PAMER, 2006).

Alguns trabalhos, na década de 90, mostraram que o TNF- $\alpha$  poderia induzir a produção de IL-6 em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* e que altos níveis de IL-6 foram detectados em plasma de animais endotoxêmicos (ENGELBERTS et al., 1991; KLOSTERHAUFEN et al., 1991). Um dos primeiros trabalhos a relacionar as concentrações plasmáticas de IL-6 com a gravidade do quadro do paciente foi realizado por Waage e colaboradores (1989), o qual demonstrou diferenças significativas entre as concentrações de IL-6 no sangue de pacientes em choque séptico e com sepse grave. Estudos posteriores confirmaram os dados de secreção de IL-6 em outros modelos experimentais de sepse e em humanos (HAMILTON et al., 1992; VILLA et al., 1995; YOSHIZAWA et al., 1996; XING et al., 1998).

A IL-6 está presente em baixas concentrações em condições fisiológicas (ROSE-JOHN et al., 2012). Entretanto, a sua produção excessiva também pode contribuir para os danos teciduais e graves complicações que são observadas durante a sepse (AKIRA et al., 1993; KISHIMOTO, 2005). A IL-6 também é uma citocina pleiotrópica, secretada por vários tipos celulares como monócitos, macrófagos, linfócitos B e T, células epiteliais, células endoteliais, fibroblastos e adipócitos (KISHIMOTO et al., 1995). A IL-6 atua como o maior regulador das respostas de fase aguda hepática e induz a expressão da proteína C ativada, fibrinogênio e proteína amilóide A (GAULDIE et al., 1987), bem como a proliferação e diferenciação das células T, macrófagos, megacariócitos e neutrófilos (OKADA et al., 1988; ISHIBASHI et al., 1989; DOMINITZKI et al., 2007; WALKER et al., 2008). A IL-6, juntamente com o TNF- $\alpha$ , causa febre e leucocitose, contribuindo assim para a eliminação de patógenos (CHEN et al., 2006). Considerando as altas concentrações de IL-6 em plasma de

pacientes sépticos, alguns estudos buscam neutralizar esta citocina em modelos animais de sepse, os quais apresentaram melhora na sobrevivência (RIEDERMAN et al., 2003; BARKHAUSEN et al., 2011). Apesar destes resultados positivos na pesquisa pré-clínica, até o momento não há ensaio clínico de tratamento para a sepse ou SIRS com anti-IL6 (KANG et al., 2015). Além das citocinas inflamatórias atuarem na resposta inflamatória da sepse, citocinas anti-inflamatórias como, por exemplo, a IL-10, também participam.

A IL-10 possui papel protetor na supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias, sendo considerada uma citocina anti-inflamatória que desempenha papel importante em infecções bacterianas persistentes (DUELL et al., 2012). As principais fontes dessa citocina são células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, células B e T (revisado por CIKTOR; TURNER, 2011; DUELL et al., 2012). Seu papel anti-inflamatório é decorrente da inibição da ação das células NK, da diferenciação de células T naïve em células T efetoras, e da inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$  por macrófagos e neutrófilos (revisado por MEGE et al., 2006).

A contribuição da IL-10 para a resposta imune durante infecções respiratórias tem sido avaliada em diferentes modelos com resultados variáveis. Por exemplo, a neutralização de IL-10, durante a infecção por *Klebsiella pneumoniae* em camundongos, leva a uma melhor depuração bacteriana e maiores taxas de sobrevivência (GREENBERGER et al., 1995). Adicionalmente, animais com deleção gênica para IL-10, infectados com dose não letal de *Bordetella parapertussis* apresentam maior inflamação pulmonar devido ao aumento do recrutamento de neutrófilos, com uma depuração bacteriana melhorada (WOLF et al., 2010).

## 1.5 DISFUNÇÃO DE ÓRGÃOS NA SEPSE

A sepse pode evoluir em casos desfavoráveis para o choque séptico, culminando com a síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (SDMO) (RANGEL-FAUSTO et al., 2005; WENZEL et al., 2002). A disfunção de órgãos (também conhecida como falência de múltiplos órgãos) decorrente da sepse é interpretada como a alteração na função orgânica de forma que a homeostasia não possa ser mantida sem intervenção terapêutica. Não deve ser considerada como fenômeno tudo ou nada, isto é, a falência

orgânica é um processo contínuo e dinâmico, que pode variar desde disfunção leve até falência total do órgão (HEARD; FINK, 1991; VARON; MARIK, 1999). A definição de disfunção de múltiplos órgãos permanece a mesma até o momento.

A taxa de mortalidade da sepse aumenta de acordo com o número de órgãos acometidos (VINCENT et al., 1996; FERREIRA et al., 2001), e quando ocorre falência renal o risco de morte duplica (OPPERT et al., 2008). As concentrações de citocinas plasmáticas podem estar relacionadas à disfunção de múltiplos órgãos (PINSKY et al., 1993; PETTILA, 2002; CHO; CHOI, 2014).

### 1.5.1 Escores clínicos

A avaliação de escores clínicos busca descrever de forma quantitativa o grau de disfunção orgânica de pacientes gravemente doentes. Um escore muito utilizado em diversos hospitais no mundo é o APACHE II. O desenvolvimento do modelo de avaliação da saúde crônica e aguda (do inglês, *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*, APACHE II) foi baseado em um estudo com pacientes nos Estados Unidos (KNAUS, 1985), e tem sido utilizado em muitas UTIs internacionalmente. O escore de fisiologia aguda III (do inglês, *Simplified Acute Physiology Score III*, SAPS III) foi validado por estudo de coorte multicêntrico e multinacional (METNIZ et al., 2005). Valores do escore APACHE II e SAPS III são calculados quando da admissão do paciente na UTI e têm sido utilizados para determinar a gravidade e os preditores de mortalidade, no sentido de direcionar a assistência dos profissionais de saúde. Na avaliação do modelo APACHE II, observam-se se os demais parâmetros como: temperatura, frequência cardíaca e respiratória, pH arterial, concentrações séricas de bicarbonato, sódio e potássio, além de hematócrito e leucócitos. Já o SAPS III avalia cerca de 20 itens e ainda, leva em consideração a etnia do paciente. O valor vai de 0 a 217 e deve ser definido na primeira hora de admissão, e não nas primeiras 24 horas, como o APACHE II e o SOFA, cujos detalhes são apresentados logo a seguir (VINCENT; MORENO, 2010).

No Brasil, foi realizado um estudo com 3.333 pacientes críticos, comparando os escores APACHE II e SAPS III, no período de 2011 e 2012. Observou-se que a avaliação do escore clínico

SAPS III apresentou melhor índice de prognóstico, com maior discriminação (SERPA NETO et al., 2015).

Há outro escore clínico, também utilizado na rotina clínica, a avaliação de falência de órgãos sequencial (do inglês, *Sequential Organ Failure Assessment*, SOFA) leva em consideração uma escala de 24 pontos destinados a avaliar a disfunção de órgãos e insuficiência em pacientes criticamente enfermos (VINCENT et al., 1996). Seis sistemas são avaliados: respiratório (oxigenação e ventilação mecânica), cardiovascular (pressão arterial), coagulação (número de plaquetas), fígado (concentração de bilirrubina) e rim (concentração de creatinina) (JONES et al., 2009). A avaliação do escore SOFA durante a primeira semana de admissão na UTI mostrou ser um bom indicador de prognóstico, e o aumento do SOFA durante as primeiras 48 horas foi capaz de prever uma taxa de 50% de mortalidade (FERREIRA et al., 2001). Um estudo mais recente, corrobora os trabalhos anteriores, pois conseguiu prever o prognóstico de pacientes sépticos com evidência de hipoperfusão no momento da entrada no setor de emergência (JONES et al., 2009). Os escores clínicos atuam como indicadores ou preditores de disfunção orgânica e mortalidade durante a sepse. Observações clínicas podem também auxiliar diferentes estudos com animais de experimentação, caso seja relevante, por exemplo, prever mortalidade ou disfunção de órgãos de animais sépticos. Há poucos trabalhos que utilizam algum escore de gravidade da doença para modelos animais de infecção ou sepse. Em 2004, dois pesquisadores, Shaver e Hauser, realizaram observações clínicas (aspecto dos olhos, aparência do corpo, atividade, consciência e respiração) escalonadas como escore da gravidade do modelo de pneumonia aguda. Alguns anos mais tarde, este escore foi adaptado por outro estudo que também quis avaliar os escores clínicos no modelo de pneumonia em camundongos (MACHADO et al., 2010). Em 2008, um estudo utilizou as seguintes informações para o escore clínico em modelo de meningite por *Streptococcus pneumoniae*: avaliação motora (atividade das patas dianteiras, esconder pata e escalar) e clínica (aspecto dos olhos, pelos e atividade) em ratos (BRANDT et al., 2008). Em modelo de ligadura e perfuração do ceco em camundongos (do inglês, *Cecal Ligation and Puncture*, CLP), outro trabalho apresentou informações em escores a respeito da avaliação da respiração, aspectos dos pelos, olhos e diarreia (MIZUKAMI et al., 2012). Cachorros sépticos de um

hospital veterinário foram submetidos a um escore clínico, no qual houve a avaliação de parâmetros hemodinâmicos (frequência cardíaca, respiratório, contagem de leucócitos e temperatura) semelhantes aos examinados em seres humanos (PASHMAKOVA et al., 2014).

## 1.6 HIPÓTESES DO TRABALHO

Os aspectos clínicos (escores clínicos) podem ser aplicados a modelos animais e serem correlacionados com mortalidade e progressão da infecção bacteriana durante a sepse.

## 1.7 OBJETIVOS

### 1.7.1 Objetivo geral

Avaliar se a utilização de escores clínicos é preditor de mortalidade e disseminação bacteriana, e se há inflamação tecidual na sepse experimental induzida por pneumonia.

### 1.7.2 Objetivos específicos

- Verificar se o escore clínico pode prever a mortalidade dos animais com sepse induzida por instilação traqueal de *K. pneumoniae*;
- Avaliar se o escore clínico pode prever o perfil de disseminação bacteriana dos animais infectados com *K. pneumoniae*;
- Avaliar a disseminação bacteriana em diferentes tecidos ao longo do tempo (2, 6 e 24 horas);
- Avaliar se nos mesmos tecidos afetados com a disseminação bacteriana, há produção de local citocinas;
- Avaliar marcadores de lesão tecidual e mensurar leucócitos, plaquetas e glicemia em animais que apresentam escores clínicos elevados.



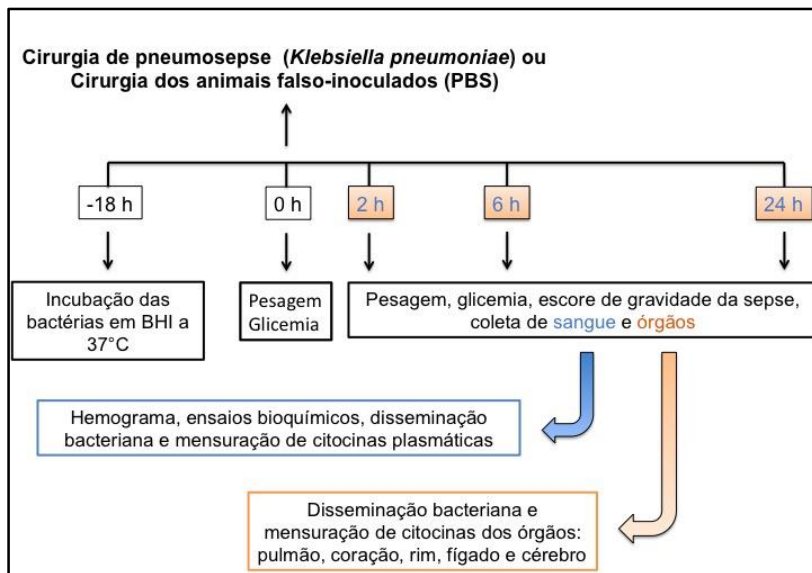
## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 ANIMAIS

Camundongos *Swiss* machos (pesando 40 g - 45 g) foram mantidos em ambiente com temperatura e luminosidade controladas ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; 12 h ciclo claro/escuro), com livre acesso à água e à ração. Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA; Projeto de Pesquisa PP0790) da Universidade Federal de Santa Catarina e estão em conformidade com as orientações do governo brasileiro para uso de animais em pesquisas (CONCEA).

### 2.2 DESENHO EXPERIMENTAL

O número amostral para cada experimento foi determinado com base nos resultados anteriores obtidos em estudos-piloto. A porcentagem de sobrevivência dos camundongos foi registrada por um período de 120 horas ( $n = 10$  por grupo). Os demais experimentos foram realizados 2, 6 e 24 horas após a inoculação bacteriana ( $n = 6-9$  animais por grupo), como mostrado no Esquema 1. Cada ponto temporal foi determinado em experimentos independentes, com diferentes grupos de animais. Para a maioria dos parâmetros analisados (escore clínico, disseminação bacteriana, citocinas e marcadores de dano de órgãos), os resultados foram obtidos a partir dos mesmos animais. Para determinar qual seria a concentração bacteriana adequada para promover sepse induzida por pneumonia com taxa de mortalidade de aproximadamente 50%, foram realizadas três curvas de sobrevida, concomitantemente com a inoculação de diferentes concentrações de unidades formadoras de colônias (UFC) ( $3 \times 10^8$ ,  $7 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$ ). Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sempre no mesmo período do dia (matutino) e cada experimento foi repetido 2 a 3 vezes, com exceção das curvas de sobrevivência, que foram realizadas apenas uma vez. Os camundongos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina 200 mg/kg e xilazina 20 mg/kg (Syntec, Hortolândia, São Paulo, Brasil), seguido por coleta de sangue via punção cardíaca e também coleta de órgãos (pulmões, coração, rins, fígado e cérebro) para análises posteriores.



**Esquema 2 - Fluxograma do desenho experimental do estudo.** As alíquotas de bactérias *Klebsiella pneumoniae* foram descongeladas, lavadas e incubadas em caldo de cérebro e coração (do inglês, brain and heart infusion - BHI) por 18 horas. Após preparação e quantificação das bactérias (*Klebsiella pneumoniae*) foi realizada a cirurgia de pneumosepse e também a cirurgia com falsa inoculação (camundongos controle receberam PBS ao invés de bactéria). No momento da cirurgia, foi verificado o peso e a glicemia dos animais. Duas, 6 e 24 horas após a cirurgia, houve coletas de dados e material biológico dos camundongos infectados e não-infectados (controle).

## 2.3 SEPSE INDUZIDA POR PNEUMONIA

### 2.3.1 Aumento da patogenicidade e expansão da bactéria

A bactéria utilizada nos experimentos foi a *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603 – *American Type Culture Collection*, Rockville, MD), gentilmente cedida pelo Prof. Fernando de Queiroz Cunha, do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP. No seu laboratório realizou-se o procedimento para aumento da patogenicidade desta bactéria por meio de passagens repetidas em camundongos C57BL/6 (CZAIKOSKI et al., 2013). O aumento da patogenicidade foi feito da seguinte forma: uma alíquota congelada de bactéria foi ressuspensa em 45 mL de caldo BHI em tubo plástico e incubada a 37°C, por 18 horas. O tubo contendo as bactérias foi centrifugado a 3500 rpm por 15 minutos em

temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi homogeneizado em 45 mL de PBS estéril (do inglês, *Phosphate-buffered saline*; NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 mM e  $\text{NaHPO}_4$  8,1 mM; pH 7,4), para lavar as bactérias. O procedimento de lavagem foi realizado duas vezes e, em seguida, adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de PBS estéril no *pellet* resultante. Três animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal (i.p.) de cetamina e tribromoetanol (25 mg/Kg e 375 mg/Kg, respectivamente). Uma incisão na pele do pescoço (5 mm na longitudinal) foi feita em condições assépticas, a musculatura foi afastada com o auxílio de pinça curva, para exposição da traqueia, e 50  $\mu\text{L}$  da suspensão de bactérias foram injetados pela via intratraqueal (i.t.). Os animais foram sacrificados após 24 horas, para a retirada do baço. Os baços dos animais foram macerados com 500  $\mu\text{L}$  de PBS estéril e 10  $\mu\text{L}$  dessa suspensão semeados em triplicata em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton. Após a semeadura, as placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas. As unidades formadoras de colônias (UFC) presentes foram ressuspensas em 45 mL de caldo BHI e incubadas a 37°C, por 18 horas, repetindo-se todo este ciclo por 10 vezes.

Após este processo, que visou aumentar a patogenicidade da bactéria em camundongos, o que foi confirmado pela mortalidade dos animais, foi realizada a expansão das colônias de bactérias. As unidades formadoras de colônia (UFC), provenientes do baço dos animais, após o procedimento indicado, foram obtidas e suspensas em 45 mL de caldo BHI em um tubo plástico e incubadas a 37°C, por 18 horas. Após a centrifugação do tubo, a 3500 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e as bactérias foram novamente suspensas em 45 mL de BHI. Este procedimento foi repetido por mais 5 dias, sendo que no quinto dia a suspensão de bactérias foi centrifugada, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado duas vezes em 45 mL de PBS estéril. O sedimento final foi suspenso em 45 mL de PBS estéril e alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  foram feitas em microtubos de plástico tipo *Eppendorf*, que foram a seguir liofilizadas (Heto-Vac CT110, Heto Lab Equipment, Berkerod, Dinamarca). As bactérias foram congeladas a -80°C em fase log de crescimento.

### 2.3.2 Quantificação do número de bactérias

As bactérias liofilizadas, que estavam armazenadas em microtubos, foram suspensas em 45 mL de caldo BHI em tubo plástico e incubadas por 18 horas, a 37°C. Após respectivas lavagens das bactérias, como descrito previamente, o *pellet* resultante foi suspenso em 500 µL de PBS estéril e colocado em microtubos. Diluições seriadas (com um fator de 10) foram realizadas e as densidades ópticas determinadas a 600 nm. Concomitantemente, 10 µL das diluições foram plaqueadas em duplicata em condição estéril, em ágar Mueller-Hinton e incubadas a 37°C, por 24 horas. Foram determinadas as UFC após 24 horas e calculada a quantidade por mL de cada diluição. Realizou-se uma regressão linear relacionando densidade ótica e UFC/mL para estimar o número de UFC de todas as alíquotas feitas nesse lote.

### 2.3.3 Inoculação de *Klebsiella pneumoniae* em camundongos

Antes de cada experimento, alíquotas individuais foram descongeladas e lavadas duas vezes em PBS estéril. Após as lavagens, as bactérias foram incubadas em caldo BHI por 18 horas, a 37°C. A suspensão de bactérias foi centrifugada e o *pellet* resultante foi lavado duas vezes e suspenso em 500 µL de PBS estéril. A concentração de bactérias foi determinada por meio da interpolação da medida da absorbância em 600 nm na regressão obtida, descrita no item 4.3.2. A suspensão de bactérias foi diluída em PBS estéril na concentração desejada para inoculação.

Para indução da pneumosepse, os animais foram anestesiados com cetamina e tribromoetanol (25/375 mg/Kg), administrados via i.p. e dispostos em posição supino inclinado (45°C). Uma incisão na pele do pescoço (5 mm na vertical) foi feita em condições assépticas. Em seguida, a traqueia foi identificada e 50 µL de suspensão bacteriana, ou PBS, foram injetados por via intratraqueal (i.t.), com uma agulha estéril de 30 G. Após sutura da pele, os animais receberam 30 mL/Kg de PBS estéril aquecido (37°C), por via subcutânea, para reposição volêmica. Os animais foram mantidos a 37°C nas suas gaiolas até a recuperação da anestesia e, posteriormente, foram alojados em ambiente com temperatura e luz controladas. Os animais controle foram falso-

inoculados, ou seja, submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos e anestésicos, porém receberam a injeção i.t. de 50 µL de PBS estéril, ao invés da injeção i.t. com conteúdo bacteriano.

## 2.4 QUANTIFICAÇÃO DA DISSEMINAÇÃO BACTERIANA

Após o procedimento de eutanásia dos camundongos, foi coletado sangue por punção cardíaca. Em seguida, os animais foram perfundidos com PBS estéril por alguns minutos, para remover o sangue restante nos tecidos. Coração, pulmão, fígado, rim e cérebro foram assepticamente coletados e homogeneizados com PBS estéril. Após diluições seriadas com um fator de 10, 10 µL de cada diluição ou sangue puro foram assepticamente plaqueadas em placas de ágar de Mueller-Hinton a 37°C. Após 24 horas, as UFCs foram contadas e os resultados foram expressos em log de UFC. Todos os tecidos de cada animal foram testados.

## 2.5 ESCORE CLÍNICO

Alguns parâmetros foram observados para avaliar o escore clínico temporalmente, visando predição da mortalidade ou disseminação bacteriana. A avaliação foi realizada de acordo com Shaver e Hauser (2004) e adaptada por Machado et al. (2010), sendo que os escores mais altos refletem o aumento da severidade da sepse. Cada animal recebeu uma pontuação total entre 0 (completamente saudável) a 6 (moribundo). Os animais foram observados em relação às características descritas no Quadro 3, a seguir.

Quadro 3 - Escores clínicos

Características	Escore		
Aparência	0 = pelos lisos	1 = pelos arrepiados	
Aspecto dos olhos	0 = normal	1 = com secreção	
Consciência	0 = alerta	1 = sonolento	
Respiração	0 = rápida normal	1 = lenta laboriosa	
Atividade	0 = ativo	1 = letárgico	2 = moribundo

## 2.6 MENSURAÇÃO DE CITOCINAS

Duas, 6 e 24 horas após a indução da pneumosepse, os animais foram sacrificados, como descrito anteriormente, e o sangue foi coletado por punção cardíaca para posterior obtenção de plasma. Em seguida, os animais foram perfundidos com PBS gelado durante alguns minutos, para remover o restante do sangue nos órgãos. Depois disso, os tecidos (pulmão, coração, rim, fígado e cérebro) foram obtidos dos animais com ou sem infecção (controle). As amostras (incluindo o plasma) foram obtidas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Todos os tecidos (com exceção do plasma) foram homogeneizados em tampão de lise (HCl 10 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1  $\mu$ M, Triton X-100 1%, pepstatina 1  $\mu$ M), centrifugadas a 12.000 *g* e o sobrenadante coletado e mantido a -80°C, para subsequente mensuração de citocinas. A detecção das citocinas foi realizada pelo método *Cytometric Bead Array* (CBA), utilizando o BD CBA *Mouse Inflammation kit* (TNF, MCP-1, IL-10 e IL-6) e realizada por citometria de fluxo (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Em resumo, os sobrenadantes e os padrões das citocinas (provenientes do *kit*) foram incubados com microesferas de captura, as quais foram recobertas com anticorpos específicos para as respectivas citocinas e também com o anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (do inglês, *phycoerythrin*, PE). Após incubação por 2 horas, em ambiente protegido da luz e em temperatura ambiente, foi adicionado 500  $\mu$ L da solução de lavagem (proveniente do *kit*) e realizada a centrifugação por 5 minutos, a 1200 *g*. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi ressuspensionado com 200  $\mu$ L da solução de lavagem. Em seguida, as amostras foram avaliadas pelo citômetro de fluxo FACSCanto II <sup>TM</sup> (BD Biosciences). Os resultados obtidos foram analisados pelo *software* FCAP Array<sup>TM</sup> (BD Biosciences) e expressos em pg/mL.

## 2.7 ENSAIOS BIOQUÍMICOS E CONTAGEM DE CÉLULAS

Os níveis plasmáticos de aspartato transferase, alanina transferase, ureia e creatinina foram mensurados por meio da utilização de kits disponíveis comercialmente (BIOCLIN, Belo Horizonte, MG, Brasil). A contagem de leucócitos e de plaquetas

foi feita utilizando um contador hematológico automático (Horiba Abx Micros 60, Shandong, China).

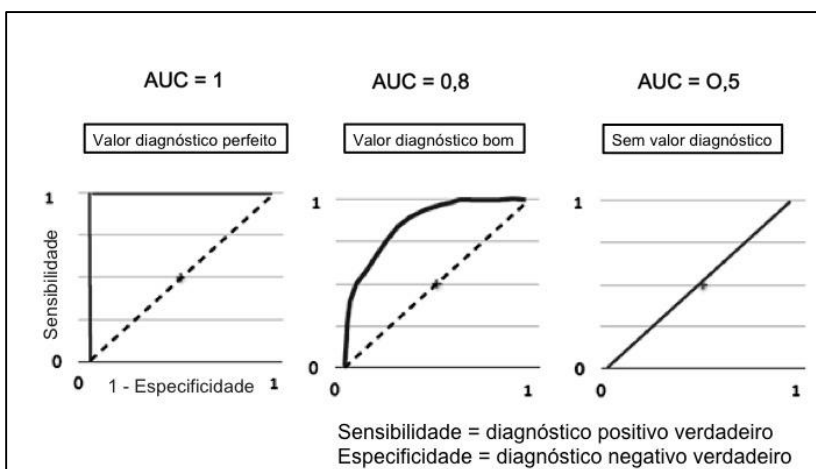
## 2.8 AVALIAÇÃO DA GLICEMIA

A obtenção de sangue para dosagem da glicemia foi realizada por meio de punção na ponta da cauda dos camundongos e consequente exposição de gota de sangue em aparelho medidor de glicose (Accu-Chek Active®, Roche, Mannheim, Alemanha). Todas as medições da glicemia foram realizadas momentos antes da cirurgia (em ambos grupos, sépticos ou falso-operados) e em determinados tempos de avaliação (2, 6 e 24 horas após a cirurgia), ou seja, cada animal serviu como seu próprio controle.

## 2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com exceção da curva de sobrevivência, todos os dados foram primeiramente testados para homogeneidade de variância (teste de Brown-Forsythe) e normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) para definir se seriam utilizados testes paramétricos ou não-paramétricos. Valores de  $P$  inferiores a 0,05 ( $P < 0,05$ ) foram considerados significativos. Para a análise do experimento da curva de sobrevida, os dados foram avaliados e analisados ponto a ponto por meio do teste *log-rank* (Mantel-Cox) com comparações múltiplas e devidamente corrigidos (limiar de Bonferroni corrigido =  $P/\text{número de comparações}$ ). A taxa de risco (*hazard ratio*) (Mantel-Haenszel) também foi calculada de forma a avaliar a probabilidade de os animais morrerem. A disseminação bacteriana, os escores clínicos, os níveis de citocinas e os ensaios bioquímicos foram testados em relação às premissas da ANOVA e foram analisados por testes não-paramétricos. Para comparar dois grupos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Já, para comparar três ou mais grupos, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn. A contagem de leucócitos e de plaquetas foi analisada por testes paramétricos. As diferenças entre os animais falso-operados e sépticos, em diferentes tempos, foram analisadas usando ANOVA de duas vias (tempo e sepse como fatores), seguidas pelo teste de comparações múltiplas de Sidak.

Além disso, a capacidade do escore clínico de discriminar animais falso-inoculados de animais sépticos foi testada usando a curva de Características de Operação do Receptor (do inglês, *Receiver Operating Characteristic*, ROC). A curva ROC é uma ferramenta poderosa para medir e especificar problemas no desempenho do diagnóstico em medicina, por permitir estudar a variação da sensibilidade e especificidade para diferentes valores de corte (BEWICK et al., 2004). A Curva ROC é um gráfico de sensibilidade (ou taxa de verdadeiros positivos) versus taxa de falsos positivos (Figura 2).



**Figura 2** - Curvas de característica de operação do receptor (ROC). Os valores da área sob a curva indicam a precisão do teste de diagnóstico. No eixo Y, encontram-se valores que determinam o diagnóstico positivo, no eixo X, encontram-se valores dos falsos positivos (1 - especificidade). Fonte: Adaptado de Martinez et al. (2003).

Esta curva é quantificada pela área sob a curva (do inglês, *area under curve* - AUC). Valores da AUC entre 0,7 e 0,8 são classificados como "aceitáveis" e valores entre 0,8 e 0,9 possuem "valores excelentes para discriminação" (HANLEY; McNEIL, 1982). Para o escore clínico, o melhor índice de Youden foi determinado para ser o ponto de corte (YODEN, 1950). A sensibilidade, especificidade e valores preditivos foram calculados com base neste escore.



Para garantir que o escore clínico pudesse refletir a gravidade do insulto séptico *per se*, foram realizadas as correlações entre o escore clínico e mortalidade, bem como entre os mesmos escores e disseminação bacteriana. Ambas as análises foram realizadas por meio do cálculo do coeficiente de correlação de Spearman (rs). A análise estatística foi realizada utilizando GraphPad Software 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

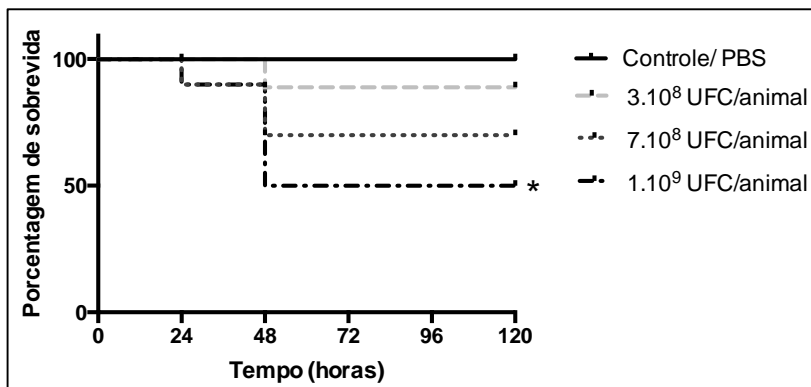
Os dados de modo geral, serão apresentados em gráficos de dispersão, barras e caixas e bigodes (do inglês, *box and whiskers*). O diagrama de caixas e bigodes nos mostra o menor escore (linha horizontal inferior em cada figura) e o maior (a linha superior horizontal de cada figura). A distância entre a linha mais inferior da caixa é o quartil inferior, entre as linhas superiores e inferiores encontra-se o intervalo interquartil. A distância entre a aresta superior da caixa e a linha horizontal superior mostra o quartil superior. No meio da caixa, há uma linha horizontal que representa a mediana.



### 3 RESULTADOS

#### 3.1 SOBREVIDA APÓS A INOCULAÇÃO DE *Klebsiella pneumoniae*

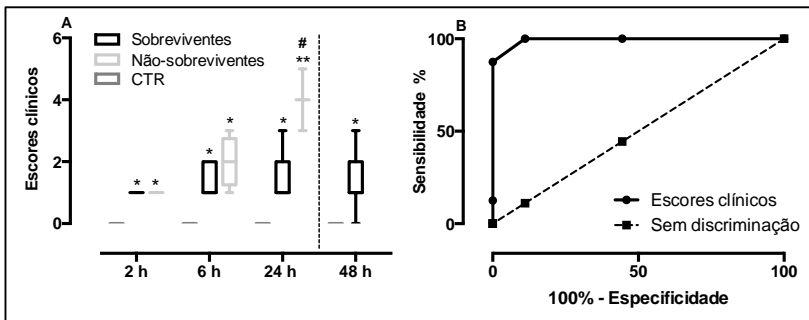
A inoculação com doses crescentes de carga bacteriana, reduziu a porcentagem de animais sobreviventes (Teste *Log-rank* Mantel-Cox,  $\text{Chi}^2 = 7,97$ ,  $P < 0,05$ ), como mostrado na Figura 3. A observação foi realizada até 120 horas após a inoculação. A análise por múltiplas comparações revelou que somente a dose de  $1 \times 10^9$  UFC/animal foi capaz de induzir uma redução estatisticamente significativa de animais sobreviventes quando comparada ao grupo falso-inoculado. Nesta dose a sobrevivência foi de 90% em 24 horas e 50% em 48 horas após inoculação, e permanecendo com esta mortalidade até 120 horas. O risco relativo (*hazard ratio*) representa a probabilidade dos animais morrerem. Os animais que receberam  $1 \times 10^9$  CFU/animal possuem 11 vezes mais chances de morrer em 48 horas dos que os animais controle (teste Mantel-Haenszel = 11,1 (1,7-73,3). Com base nestes achados, selecionamos esta carga bacteriana de *K. pneumoniae* para os demais experimentos, pois apresenta uma curva de mortalidade de 50% em 48 horas e elevada taxa de risco de morte.



**Figura 3 - Curva de sobrevivência de camundongos infectados com *Klebsiella pneumoniae*.** Animais foram inoculados (via intratraqueal) com doses crescentes de bactéria ( $3 \times 10^8$ ,  $7 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  CFU/ animal); animais controle (falso-inoculados) receberam PBS e não exibiram mortalidade. Os resultados foram expressos como porcentagem de sobrevivência. A análise estatística foi realizada pelo teste log-rank (Mantel-Cox),  $P < 0,05$ . Análise ponto a ponto foi efetuada para correção de múltiplas comparações (Limiar corrigido por Bonferroni =  $P/\text{número de comparações}$  ou  $0,05/3 = 0,017$ . Falso-inoculado versus  $3 \times 10^8 = P = 0,3$ , Falso-inoculado versus  $7 \times 10^8 = P = 0,06$  e  $1 \times 10^9 = P = 0,012$ .  $N = 10$  por grupo.

### 3.2 ESCALA DE ESCORES CLÍNICOS OBSERVADO DURANTE A PNEUMOSEPSE

Para avaliar se um escore clínico poderia ser preditivo de mortalidade neste modelo de pneumosepse, utilizou-se como base o trabalho de Shaver e Hauser (2004), conforme adaptado por Machado e colaboradores (2010). Para tanto, os mesmos animais foram avaliados ao longo dos dias. O escore clínico foi zero para o grupo controle e os escores dos grupos infectados (sobreviventes e não sobreviventes) diferiram dos animais falso-inoculados em todos os tempos observados (Figura 4A). O escore clínico entre os animais que foram inoculados com *K. pneumoniae* foi similar em 2 e 6 horas (sobreviventes e não-sobreviventes) após a inoculação com a bactéria. Entretanto, os escores clínicos foram maiores em animais não-sobreviventes quando comparados aos animais sobreviventes em 24 horas após a inoculação (Figura 4A).



**Figura 4 - Escores clínicos e curva característica de operação do receptor (ROC).**

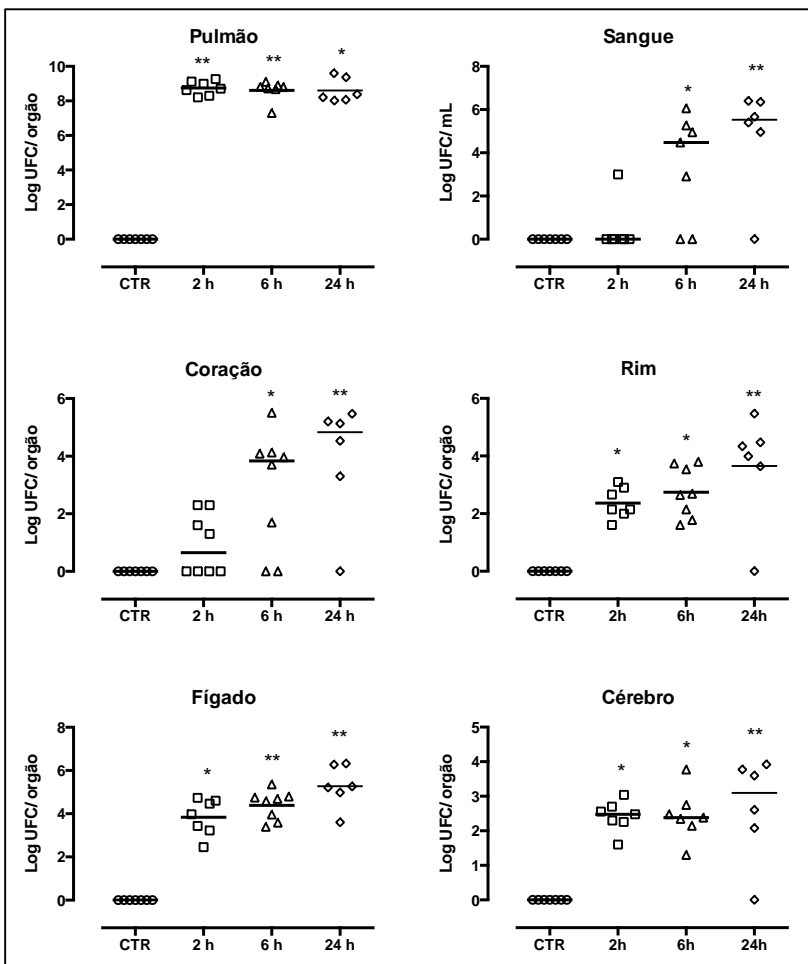
Animais controle (não-infectados, CTR), sobreviventes (animais infectados) e não-sobreviventes (animais infectados) foram pontuados em escores (A) de 0 (controles) a 6 (moribundo) em diferentes tempos, após a inoculação com *K. pneumoniae* (2, 6 e 24 h). A curva ROC para o limiar do escore clínico em 24 horas indica o risco de mortalidade (B). Escores altos refletem aumento de probabilidade da mortalidade. Em 2, 6 e 24 horas foram realizadas análise não-paramétrica Kruskal-Wallis seguido de teste de comparações múltiplas. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  quando comparado ao grupo controle, #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo sobrevivente. A análise do grupo 48 horas foi executada através do teste não-paramétrico Mann-Whitney. \* $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle.

Em seguida, foi calculado o limiar de escore clínico em 24 horas que poderia prever o risco de mortalidade 48 horas após a infecção. Com base na curva ROC para os escores (Figura 4B), a área sob a curva (do inglês, *area under curve* - AUC) foi 0,99 (intervalo de confiança de 95%, 0,96-1,02) e valor de  $P = 0,0006$ , valores que sugerem que o sistema de escores tem excelente poder discriminativo.

O escore clínico de 3 foi selecionado como o ponto de corte para animais que possuem prognóstico ruim (morte) 48 horas após a infecção, já que este escore teve o melhor escore de Youden (0,889) quando comparado aos demais limiares. No escore 3, a sensibilidade (intervalo de confiança de 95%) se refere à porcentagem de animais mortos que o teste identifica como positivo, e a especificidade (intervalo de confiança de 95%) trata-se dos animais sobreviventes que o teste identifica como negativo. Neste escore de 3, a sensibilidade foi de 100% (63-100%) e a especificidade foi de 89% (52-99%). Isto indica que a utilização de valores dos escores iguais ou maiores que 3 possuem grande habilidade de verificar verdadeiros positivos e negativos em relação a predição da mortalidade (com nenhuma ou pouca chance de apresentar falsos positivos ou negativos).

### 3.3 CURSO TEMPORAL DA DISSEMINAÇÃO BACTERIANA

Inicialmente, o interesse foi de avaliar como se daria a disseminação bacteriana e qual o curso temporal dela. Os dados apresentados são dos mesmos animais, ou seja, os dados são de grupos dependentes. Nossos resultados apresentados na Figura 5 mostram que a disseminação bacteriana ocorreu para vários tecidos que mostraram, inclusive, carga bacteriana maior do que a encontrada no sangue dos animais avaliados. Os tecidos avaliados no processo infeccioso, além do tecido sanguíneo, foram pulmão (foco infeccioso), coração, rim, fígado e cérebro. Via de regra, a disseminação bacteriana já foi encontrada no curto tempo de 2 horas após a inoculação e permaneceu elevada nos demais períodos (6 e 24 h).

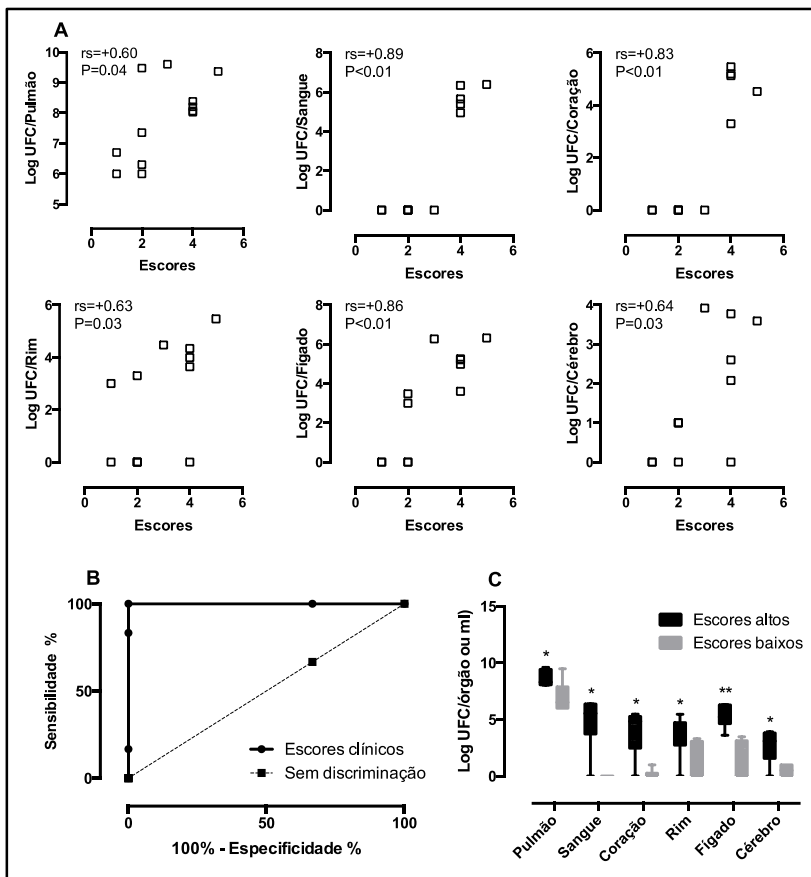


**Figura 5 - Curso temporal da disseminação bacteriana em diferentes órgãos de camundongos inoculados com *Klebsiella pneumoniae*.** Animais receberam  $1 \times 10^9$  UFC/ animal de *K. pneumoniae* (i.t.) e 2, 6 e 24 horas após a inoculação, pulmão, sangue, coração, rim, fígado e cérebro foram coletados, homogeneizados e diluídos para crescimento em placas de ágar Mueller-Hinton. Os animais CTR receberam PBS (i.t.). As unidades formadoras de colônias foram contabilizadas após 24 horas de incubação a 37°C. Cada animal é representado por símbolo individual, e a barra horizontal é a mediana. Os dados estão expressos como log de UFC, N= 7–9 animais por grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. \*P < 0,05 \*\*P < 0,01, quando comparados ao grupo controle (falso-inoculado).

Investigou-se também se os escores clínicos poderiam estar relacionados com a disseminação bacteriana em diferentes tecidos, 24 horas após a inoculação de *K. pneumoniae* nos animais. Existe correlação positiva significativa ( $P < 0,05$ ) entre os escores clínicos e disseminação bacteriana não somente nos pulmões mas também em todos os tecidos investigados, os quais incluem o tecido sanguíneo, cardíaco, renal, hepático e cerebral (coeficiente de correlação não-paramétrica de Sperman – rs). O coeficiente de correlação foi 0,60 (pulmão); 0,89 (sangue); 0,86 (fígado); 0,83 (coração); 0,63 (rim) e 0,64 (cérebro). Desta maneira, existe um bom grau de relação entre o aumento do escore clínico e disseminação bacteriana, principalmente no coração, rim e fígado (Figura 6A).

O passo seguinte foi calcular o limiar do escore clínico que poderia indicar o risco de disseminação bacteriana de 3 ou mais órgãos, 24 horas após a indução da infecção. Com base na curva ROC gerado para os escores clínicos (Figura 6B), a área sob a curva (AUC) foi 1,0 com  $P = 0,0039$ . Como observado na mortalidade, o escore de 3 foi selecionado como o ponto de corte pois apresenta maior escore de Youden (1,0) do que os demais escores. No limiar de 3, ambos sensibilidade e especificidade ( $\pm 95\%$  I.C.) foram 100% (54-100%), sendo assim, escores acima de 3 não são somente discriminativos para a mortalidade, mas também para disseminação bacteriana (Figura 6B). Além disso, os animais foram estratificados em dois grupos (escores clínicos altos e baixos), sendo que os animais sobreviventes apresentaram escores abaixo de 3 e menor carga bacteriana em alguns órgãos. Entretanto os animais não-sobreviventes, com escores iguais ou maiores que 3, apresentaram maior carga bacteriana em todos os tecidos observados (6C) e, quando comparados estatisticamente, apresentam diferença significativa em todos os órgãos. Os experimentos seguintes foram realizados com animais com escores iguais ou acima de 3 devido à alta probabilidade de apresentarem alta disseminação bacteriana e mortalidade neste modelo de pneumosepse.



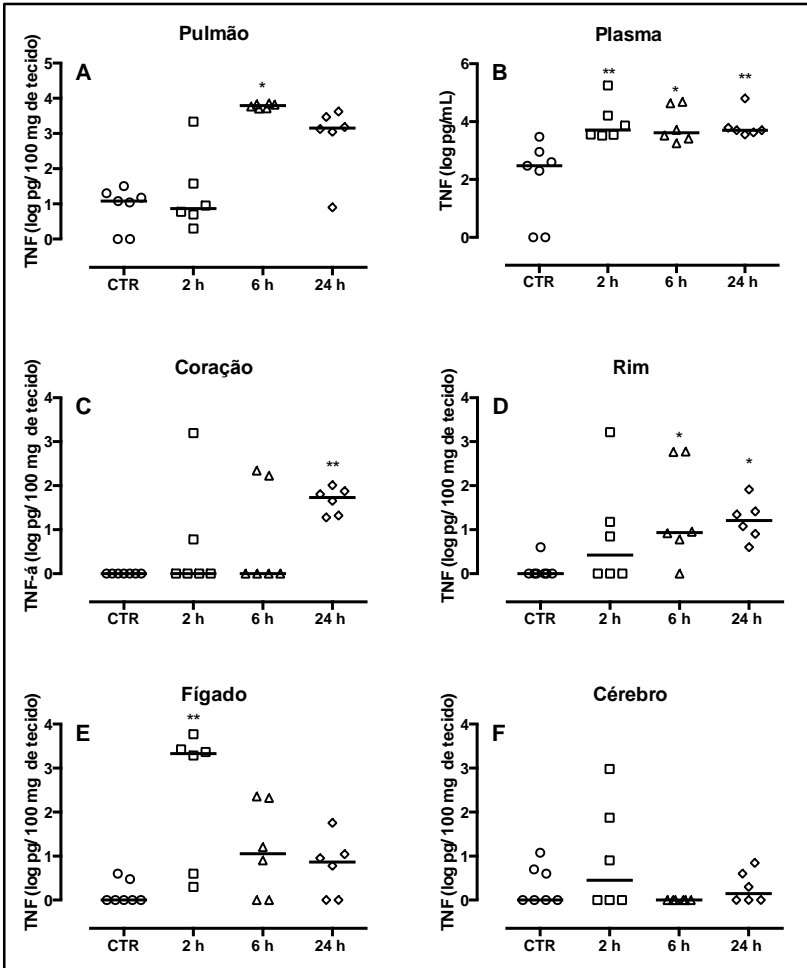


**Figura 6 - Relação entre disseminação bacteriana e escores clínicos.** A correlação foi realizada 24 horas após a inoculação de *Klebsiella pneumoniae* e todos os tecidos foram correlacionados (pulmão, sangue, coração, rim, fígado e cérebro) com a gravidade da doença. Coeficiente de correlação não-paramétrica de Sperman ( $rs$ ) está mostrado em cada gráfico, assim como o valor de  $P$ ,  $N = 12$ . Em alguns tecidos não foi possível observar os valores correspondentes aos 12 animais, pois alguns animais apresentaram valores iguais em relação aos escores e disseminação bacteriana, desta forma, apresentam-se sobrepostos no gráfico (A). A curva ROC para os escore de gravidade da doença e disseminação bacteriana (disseminação para 3 ou mais órgãos) está apresentada em B. A correlação entre todos os tecidos analisados e o escore estratificado (escores acima de 3) e a disseminação bacteriana (em mais que 3 órgãos) está mostrada em C. \* $P < 0,05$  e  $P < 0,01$  quando comparado ao grupo com escores clínicos baixos ( $< 3$ ).

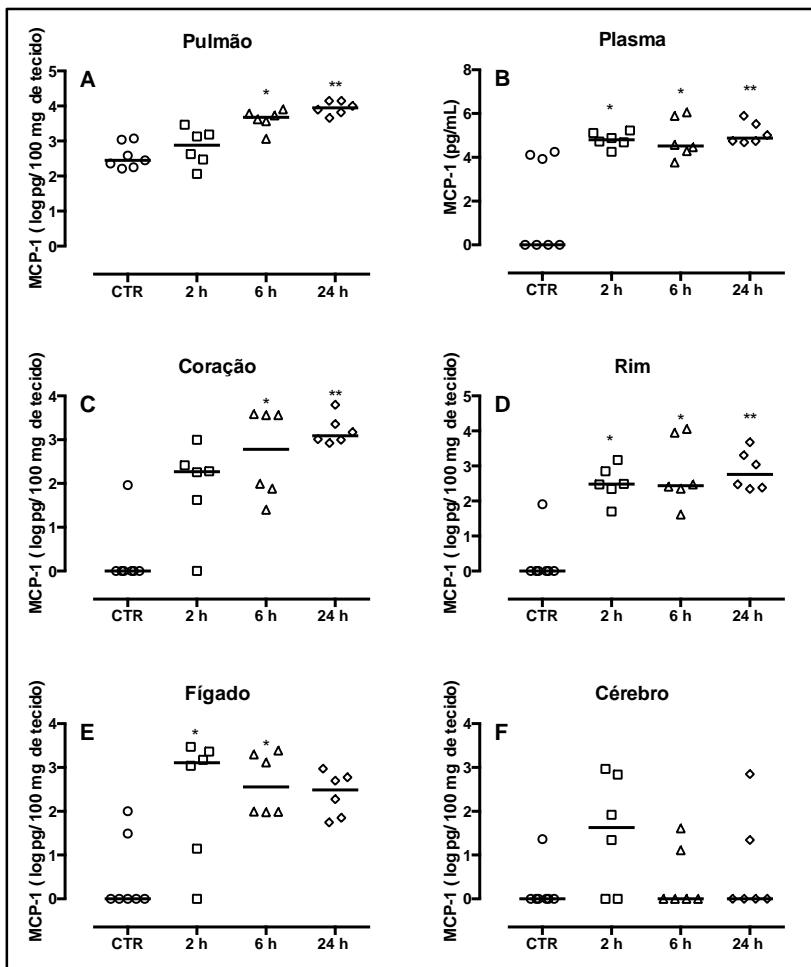
### 3.4 CITOCINAS PLASMÁTICAS E TISSULARES

Este bloco de experimentos traz resultados a respeito das concentrações de citocinas em diferentes tecidos. Para este conjunto de experimentos foi utilizado somente um grupo falso-inoculado para comparação com os demais grupos (animais pneumosépticos), haja vista que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos falso-inoculados em 2, 6 e 24 horas. Quatro citocinas foram avaliadas simultaneamente de cada animal, uma vantagem observada pelo ensaio de citometria e suas marcações nas microesferas. As citocinas pró-inflamatórias mensuradas neste estudo foram: fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) e interleucina 6 (IL-6), assim como a citocina anti-inflamatória, a interleucina 10 (IL-10). As concentrações de citocinas no foco infeccioso (pulmão) mostraram-se aumentadas 6 e 24 horas após a indução da pneumonia para TNF- $\alpha$  (Figura 7A), MCP-1 (Figura 8A) e IL-6 (Figura 10A) quando comparados ao grupo controle. Em relação à citocina anti-inflamatória IL-10, 2 e 24 horas após a inoculação houve aumento de suas concentrações no pulmão (Figura 9A). As concentrações da maioria das citocinas pró-inflamatórias plasmáticas estudadas demonstraram-se aumentadas (Figuras 7B, 8B, 10B) em todos os tempos avaliados (2, 6 e 24 h), e a IL-10 demonstrou diferença estatística significativa em 2 e 24 horas quando comparado ao grupo falso-inoculado (Figura 9B). O tecido cardíaco apresentou aumento das concentrações de todas as citocinas 24 horas após a indução da pneumosepse (Figuras 7C, 8C, 9C e 10C), porém os níveis de MCP-1 se mostraram elevados já em 6 horas após a pneumosepse (Figura 8C). Já o tecido renal demonstrou aumento dos níveis das citocinas IL-6 e MCP-1 a partir de 2 horas e permanecem elevadas até 24 horas após a inoculação com *K. pneumoniae* (Figuras 8D e 9D). Os níveis de TNF aumentaram no rim a partir de 6 horas e se manteve elevado até 24 horas (Figura 7D), entretanto, os da citocina IL-10 não apresentaram diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle (Figura 9D). No tecido hepático, houve aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  e MCP-1 em 2 horas após a indução da pneumosepse (Figura 7E e 8E) e os níveis de IL-10 apresentou aumento somente 6 horas (Figura 9E), enquanto a IL-6 demonstrou-se elevadas em todos os tempos observados (2, 6 e 24 h) após a inoculação

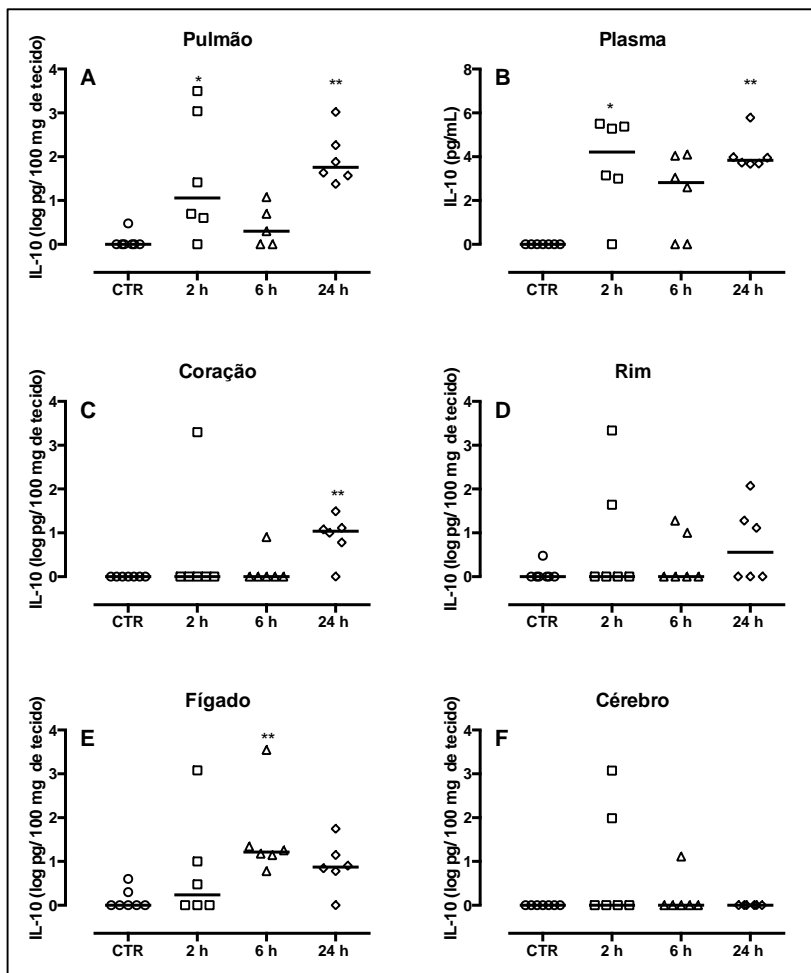
bacteriana (Figura 10E). O tecido cerebral não apresentou níveis elevados de TNF- $\alpha$ , MCP-1 e IL-10 (Figuras 7F, 8F e 9F) em todos os períodos observados, entretanto as concentrações de IL-6 se mostraram elevadas 24 horas após a cirurgia de indução da pneumosepse (Figura 10F).



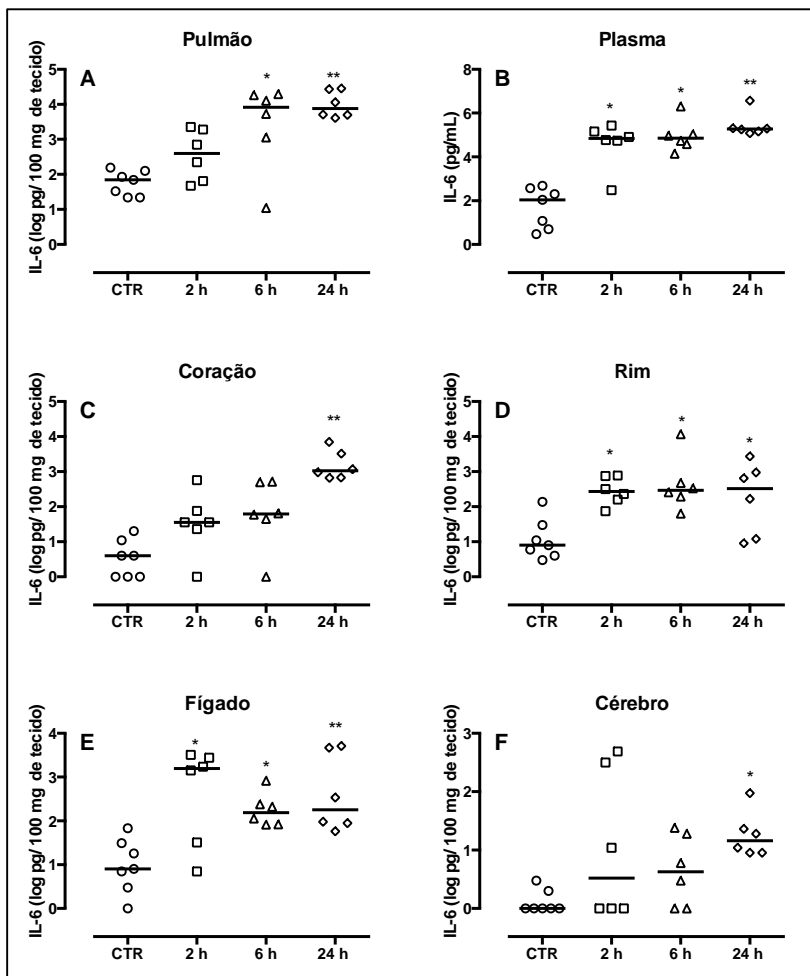
**Figura 7 - Avaliação dos níveis plasmáticos e tissulares de TNF-  $\alpha$  de animais sépticos e controles.** Camundongos receberam  $1 \times 10^9$  UFC de *K. pneumoniae* e 2, 6 e 24 horas após a cirurgia, plasma e tecidos foram obtidos e preparados para realização da mensuração das citocinas por citometria de fluxo. Cada animal é representado por símbolo individual, e a barra horizontal é a mediana. Os dados estão expressos como log de UFC, N= 7–9 animais por grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn. \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$ , quando comparados ao grupo controle (falso-inoculado).



**Figura 8 - Avaliação dos níveis plasmáticos e tissulares de MCP-1 de animais sépticos e controles.** Camundongos receberam  $1 \times 10^9$  UFC de *K. pneumoniae* e 2, 6 e 24 horas após a cirurgia, plasma e tecidos foram obtidos e preparados para realização da mensuração das citocinas por citometria de fluxo. Cada animal é representado por símbolo individual, e a barra horizontal é a mediana. Os dados estão expressos como log de UFC, N= 7–9 animais por grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn. \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$ , quando comparados ao grupo controle (falso-inoculado).



**Figura 9 - Avaliação dos níveis plasmáticos e tissulares de IL-10 de animais sépticos e controles.** Camundongos receberam  $1 \times 10^9$  UFC de *K. pneumoniae* e 2, 6 e 24 horas após a cirurgia, plasma e tecidos foram obtidos e preparados para realização da mensuração das citocinas por citometria de fluxo. Cada animal é representado por símbolo individual, e a barra horizontal é a mediana. Os dados estão expressos como log de UFC, N = 7–9 animais por grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn. \* P < 0,05 e \*\* P < 0,01, quando comparados ao grupo controle (falso-inoculado).

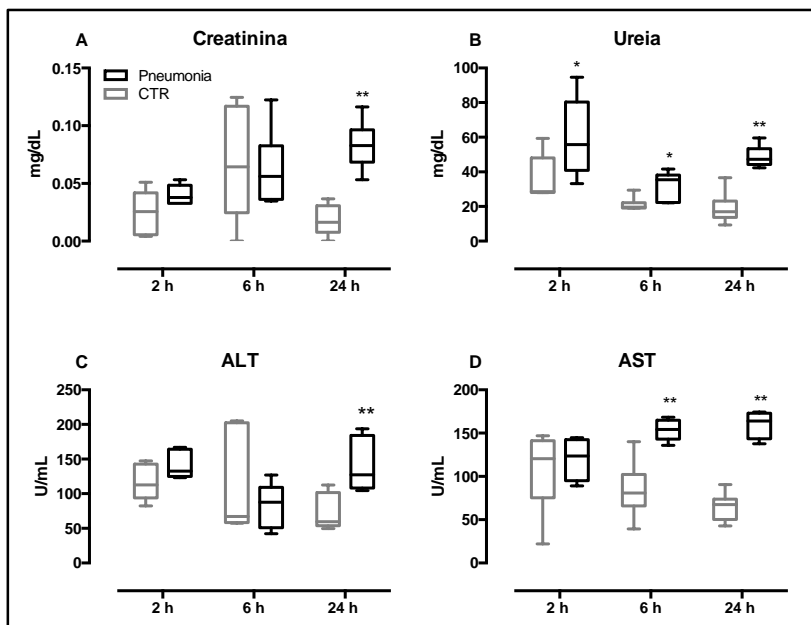


**Figura 10 - Avaliação dos níveis plasmáticos e tissulares de IL-6 de animais sépticos e controles.** Camundongos receberam  $1 \times 10^9$  UFC de *K. pneumoniae* e 2, 6 e 24 horas após a cirurgia, plasma e tecidos foram obtidos e preparados para realização da mensuração das citocinas por citometria de fluxo. Cada animal é representado por símbolo individual, e a barra horizontal é a mediana. Os dados estão expressos como log de UFC,  $N = 7-9$  animais por grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn. \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$ , quando comparados ao grupo controle (falso-inoculado).

### 3.5 MARCADORES DE DANO DE ÓRGÃOS

Posteriormente, verificamos se a infecção promovida por *Klebsiella pneumoniae* poderia induzir um aumento dos níveis plasmáticos de marcadores de dano de órgãos. Verificamos que os marcadores de dano nos animais controle (falso-inoculados) se encontravam mais elevados em 2 ou 6 horas, em relação a 24 horas após o procedimento, possivelmente relacionado ao processo cirúrgico. Ureia e creatinina são, ambos, utilizados como marcadores de lesão renal. A creatinina apresentou aumento somente 24 horas após a indução da infecção, quando comparada ao grupo falso-inoculado (Figura 11A). Entretanto, os níveis de ureia apresentaram-se elevados em todos os tempos observados (2, 6 e 24 h) mesmo considerando os valores ainda elevados do grupo falso-inoculado (Figura 11B). O dano hepático foi evidenciado por aumento significativo de concentrações séricas de alanina transferase (ALT; Figura 11C) em 24 horas e aspartato transferase (AST; Figura 11D) em 6 e 24 horas nos grupos com pneumonia, quando comparados ao grupo falso-inoculado.

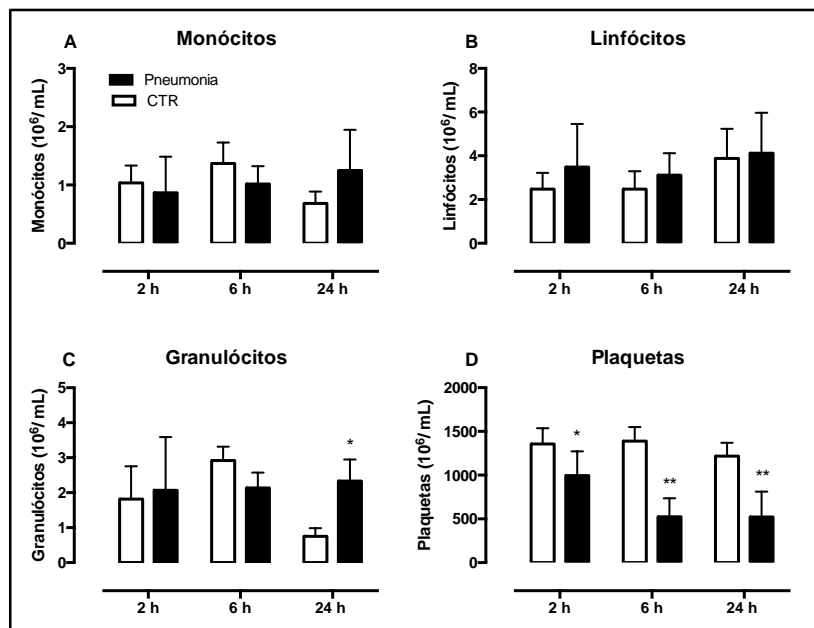




**Figura 11 - Marcadores de dano de órgãos em animais inoculados com *Klebsiella pneumoniae*.** Os animais receberam  $1 \times 10^9$  UFC de *K. pneumoniae* e nos períodos mostrados após a infecção, amostras de plasma foram obtidas para ensaio bioquímico com os marcadores. ALT, alanina transferase; AST: aspartato transferase. Os resultados foram analisados por meio de teste não-paramétrico de Mann-Whitney. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, quando comparado ao grupo falso-inoculado.

### 3.6 CONTAGEM DE LEUCÓCITOS E PLAQUETAS

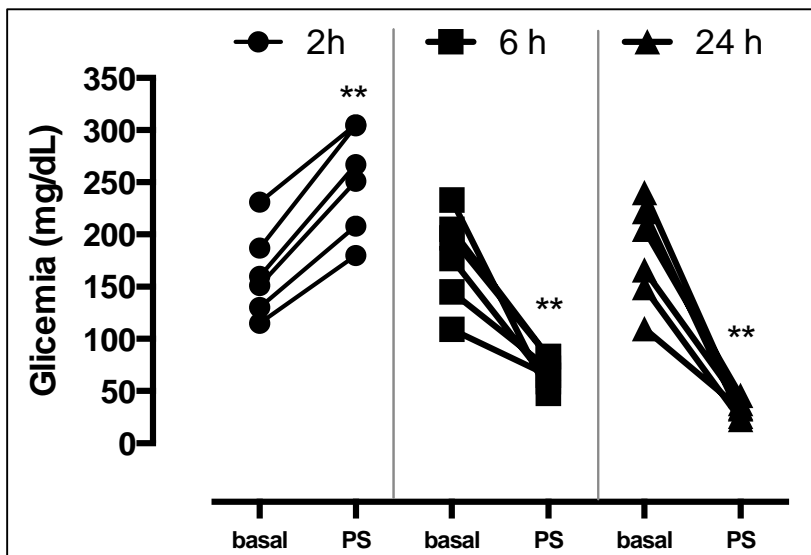
A fim de avaliar qual o perfil celular do sangue durante o processo infeccioso/séptico, foi realizada a contagem diferencial de leucócitos e de plaquetas nos animais com pneumosepse e falso-inoculados. Não houve diferença estatisticamente significativa na contagem de linfócitos e monócitos entre os grupos infectados e não-infectados (falso-inoculados) (Figura 12A e 12B), embora tenha sido observado um aumento de neutrófilos em 24 horas no grupo pneumosepse (Figura 12C). Houve uma trombocitopenia (plaquetopenia) consistente e progressiva ao longo da sepse, já observada a partir de 2 horas após a infecção, mantendo-se até 24 horas (Figura 12D).



**Figura 12 - Contagem de leucócitos e plaquetas de animais com pneumosepse e falso-inoculados.** Duas, 6 e 24 horas após a inoculação com *K. pneumoniae* ( $1 \times 10^9$  UFC/animal, i.t.) ou administração de PBS (i.t.), foi coletado sangue dos animais via punção cardíaca. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de 6 animais por grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Sidak. \*  $P < 0,05$  ou \*\*  $P < 0,01$  quando comparado ao grupo falso-inoculado.

### 3.7 GLICEMIA

Os valores basais de glicemia dos camundongos foram determinados momentos antes da cirurgia de indução da pneumosepse. Pode-se observar que a variabilidade em relação aos valores basais observados é alta, assim como no grupo infectado 2 horas após a inoculação. Os animais apresentaram-se hiperglicêmicos durante as primeiras 2 horas iniciais da pneumonia, apresentando diferença estatística quando comparado ao grupo controle. Seis e 24 horas após a indução da pneumosepse, os animais demonstraram diminuição significativa dos níveis de glicose no sangue.



**Figura 13 - Avaliação da glicemia de animais com pneumosepse.** Duas, 6 e 24 horas após a inoculação com *K. pneumoniae* ( $1 \times 10^9$  UFC/animal, i.t.), uma gota de sangue da cauda dos animais foi coletada para análise dos níveis de glicose. Os dados representam valores individuais de 6 animais por grupo (grupos experimentais independentes). A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Sidak. \*\*  $P < 0,01$  quando comparado ao basal do mesmo animal.



## 4 DISCUSSÃO

A bactéria *Klebsiella pneumoniae* foi escolhida para este estudo por vários motivos. Dentre eles, por ser ela umas das principais bactérias gram-negativas responsáveis pela sepse nosocomial, principalmente a provocada por pneumonia (ALBERTI et al., 2002; revisado por TSIOTOU et al., 2005). Além disso, o modelo animal de sepse induzida por inoculação intratraqueal de *K. pneumoniae* é bastante reprodutível e bem padronizado em laboratório, como já demonstrado em diferentes publicações do nosso grupo que utiliza esse mesmo modelo (SORDI et al., 2013a; SORDI et al., 2013b, HOREWICZ et al., 2015), além de o modelo ter sido utilizado também por outros grupos de pesquisa (SOARES et al., 2006; CZAİKOSKI et al., 2013; De STOPPELAAR et al., 2015). A dose de bactéria adotada neste trabalho ( $1 \times 10^9$  UFC/animal) foi determinada por meio da porcentagem de mortalidade apresentada, ou seja, 50% em 48 horas. Considerando que este modelo de sepse é agudo, ele pode ser espelhado (com escala temporal diferenciada, pois a avaliação da mortalidade em pacientes é realizada em 28 dias) na realidade clínica, na qual as taxas de mortalidade de sepse e choque séptico no Brasil e no mundo varia de 40 a 60% (LEVY et al., 2010; ILAS, 2004). Além disso, a taxa de risco (*hazard ratio*) de morte foi calculada e o resultado mostrou que estes animais apresentam cerca de 11 vezes maior chance de morrer quando recebem a dose de bactéria de  $1 \times 10^9$  UFC. Esta taxa de risco é relativamente alta, quando comparada ao estudo clínico em pacientes com pneumonia, os quais apresentam a taxa de risco entre 1,6 a 4,1. A taxa de risco de 1,6 se refere ao momento da admissão no hospital, já a taxa de 4,1 ocorre quando os pacientes possuem bacteremia (PLANQUETTE et al., 2013). Entretanto, estes pacientes apresentam somente pneumonia e não foram diagnosticados com sepse, sendo assim, diante deste fato pode-se sugerir que o valor da taxa de risco seja superior em pacientes com sepse induzido por pneumonia. Ainda no estudo de Planquette e colaboradores (2013), pacientes com altos escores de disfunção de órgãos tiveram risco de morte de cerca 2,7 vezes do que os pacientes com pneumonia. Sendo assim, no presente estudo, tanto o microrganismo utilizado como a via de administração adotada e as taxas de mortalidade e risco avaliadas parecem ter relação com a sepse induzida por pneumonia em

seres humanos (validade de construto). A validade de construto avalia o quanto o modelo reproduz os mecanismos biológicos de alguma síndrome.

A avaliação de escores clínicos na sepse é importante para prever o prognóstico individual do paciente por meio da redução de incertezas, assim como favorecer a tomada de decisões terapêuticas. Os sistemas de escores clínicos foram criados com o intuito de estratificar adequadamente os pacientes com sepse e, desta forma, podem facilitar a avaliação qualitativa e permitir comparações com base de dados em grande escala. Existem vários sistemas de escores clínicos sendo utilizados em UTIs pelo Brasil e pelo mundo, sendo que o APACHE II e o SOFA são os mais utilizados e podem ser usados para prever a mortalidade e disfunção de órgão dos pacientes sépticos (NOGUEIRA et al., 2007; HWANG et al., 2012). As informações obtidas pelos escores possuem várias implicações, desde avaliação diagnóstica/prognóstica até a utilização destes sistemas para estudos clínicos com diferentes tratamentos. Apesar de o APACHE ter sido criado há 30 anos para uso em humanos, há poucos estudos sobre escores clínicos em animais de experimentação. Considerando que estudos sobre a fisiopatologia da sepse e de novas terapias são primariamente pesquisadas e ensaiadas em modelos animais (HUET et al., 2013), é importante aumentar o conhecimento relativo aos escores de gravidade da sepse em animais de experimentação.

O sistema de escore clínico escolhido neste estudo foi uma adaptação de Hauser e Shaver (2004) realizada por Machado e colaboradores (2010), na qual 5 itens foram avaliados (aparência, atividade, aspectos dos olhos, consciência e atividade), sendo que o escore máximo é 6 e o mínimo 0. Utilizamos este escore para determinar a probabilidade de mortalidade, disseminação bacteriana e relacionar com a produção de citocinas, em nosso modelo de pneumosepse. Em nosso trabalho, a avaliação dos escores clínicos foi realizada em 2, 6, 24 e 48 horas (até quando há mortalidade). Verificou-se que os escores entre os sobreviventes e não-sobreviventes foram semelhantes nas horas iniciais (2 e 6 h). Assim, a análise nos tempos iniciais da sepse não permitiram tirar qualquer conclusão. Já em 24 horas os escores foram muito maiores no grupo não-sobreviventes (com escores acima de 3). No tempo de 48 horas não foi possível realizar a análise do escore clínico, pois os animais não

sobreviveram para fazer a comparação. Por esta razão, calculou-se o limiar do escore clínico em 24 horas para avaliar se ele poderia prever o risco de mortalidade em 48 horas, quando há 50% de mortalidade em animais inoculados com  $1 \times 10^9$  UFC. Como o nosso objetivo foi correlacionar os dados dos escores clínicos com as demais variáveis, foi necessário determinar o limiar como o ponto de corte (avaliado por meio do índice de Youden) do escore clínico que iria prever a melhor taxa de risco de mortalidade. De acordo com o índice de Youden, deve-se optar pelo escore que apresente a menor soma das proporções de erro de classificação, ou seja, aquele que tiver o maior valor do índice de Youden (com o valor ideal igual a 1). Neste estudo foi verificado que o escore 3 apresentou índice de 0,889 (melhor índice, quando comparado aos demais escores), sugerindo assim, que seja um bom índice para ponto de corte, já que valores próximos de 1 indicam haver menores dados falso positivos ou negativos. Em um estudo realizado em 2014 por Shrum e colaboradores, foi desenvolvido um escore de sepse murino que avaliou 7 variáveis clínicas no modelo de sepse polimicrobiana (*fecal slurry*), no qual o respectivo ponto de corte apresentou índice de Youden de 0,61 (SHRUM et al., 2014).

De acordo com os dados deste estudo, o ponto de corte, assim como o escore clínico, mostraram-se confiáveis em prever a mortalidade dos animais. E esta predição pode ser uma informação muito relevante em quase todos os estudos com animais de experimentação na área da sepse. As observações clínicas dos pacientes são também realizadas na rotina hospitalar e a intenção de fazer pesquisa básica é justamente se aproximar o máximo possível da realidade patológica humana (validade aparente, que avalia o quanto um modelo é capaz de reproduzir sinais e sintomas e/ou comportamentos da síndrome).

Além disso, avaliando os escores de gravidade da sepse, pode-se inferir qual será o *endpoint* da curva de sobrevida ou tratamento, e interromper o experimento com o objetivo de não prolongar desnecessariamente o sofrimento dos animais (NEMZEK et al., 2004; LILLEY et al., 2015). Tão importante quanto isso, o estabelecimento de um sistema de escore clínicos para experimentos em animais sépticos que possa ter relação com os escores aplicados a humanos pode ser de grande valia para considerar novos procedimentos ou terapias que, mesmo não

alterando a mortalidade, possam trazer melhoria na qualidade de vida durante o quadro séptico.

Após a definição do ponto de corte, avaliado pelo índice de Youden, foi calculada a área sob a curva do teste ROC. O teste ROC e seu respectivo valor da área sob a curva é um simples teste de diagnóstico para uma doença ou algum desfecho que classifica os pacientes em dois grupos: aqueles que têm a doença e aqueles que não apresentam a doença (BEWICK et al., 2004). Esta análise pode ser utilizada em diferentes contextos na sepse, como abordado por Drechsler e colaboradores (2015), os quais verificaram a temperatura dos animais e, diante desta informação, calcularam a probabilidade de morte destes indivíduos sépticos ( $< 28^{\circ}\text{C}$ , AUC = 0,93), este valor de AUC indica boa discriminação probabilidade de morte. Diante de alguns sinais e sintomas, como é o caso da avaliação do escore clínico murino, podemos prever a mortalidade dos animais com pneumosepse.

Verificou-se que a probabilidade dos animais com escores acima de 3 morrerem por pneumosepse é de 100% (sensibilidade = 1, positivo verdadeiro), sem falsos positivos e que a probabilidade dos animais que vieram a sobreviver possuírem escore abaixo de 3 é de 89% (especificidade = 0,89, negativo verdadeiro), com 11% de chances de haver falso negativo. Desta forma, o ponto de corte 3 foi excelente para discriminar em 24 horas após a inoculação, quais animais iriam morrer ou não em 48 horas (curva de mortalidade de 50% em 48 h). A precisão da área sob a curva do teste ROC é definida como excelente entre 0,9 e 1; boa para 0,8 e 0,9; razoável de 0,7 a 0,8; ruim entre 0,6 e 0,7; e insignificante  $< 0,6$  (DRECHSLER et al., 2015). No presente estudo, o valor obtido foi de 0,899 (no limite do bom e excelente). No contexto deste estudo, foi importante avaliar os escores clínicos, uma vez que eles são capazes de prever a mortalidade dos animais com sepse induzida por pneumonia. Além de constituírem bons preditores da mortalidade neste modelo animal, os escores também foram avaliados e correlacionados com a disseminação bacteriana, aspecto a ser discutido a seguir.

A disseminação bacteriana observada neste estudo revelou que já em estágios bastante iniciais da infecção pulmonar (2 h após a indução da pneumonia), a *K. pneumoniae* translocou-se para o coração, rim, fígado e cérebro. Entretanto, somente em alguns animais foi possível detectar bactérias no sangue (principalmente, 6 e 24 h). Um estudo publicado em 2012, por van



der Windt e colaboradores, apresentou dados a respeito da disseminação bacteriana 3 horas após a indução de pneumonia por *Streptococcus pneumoniae*, porém somente no sangue, baço e pulmão. Apesar de aparentemente contraditório, é muito comum pacientes e animais apresentarem bacteremia transitória durante a sepse, pois o sangue possui várias células imunes. Sendo assim, é provável que as células sanguíneas fagocitem e destruam grande parte das bactérias que entram na corrente sanguínea, fazendo um efetivo *clearance*. Além disso, as células de defesa, assim como células endoteliais, expressam proteínas e liberam moléculas que auxiliam no combate à infecção e inflamação na circulação (revisado por MUNFORD, 2006; revisado por PARLATO; CAVAILLON, 2015). Apesar disso, é inequívoco que algumas bactérias sobrevivam a esta passagem pela circulação, uma vez que há disseminação bacteriana no organismo. A habilidade das bactérias circulantes em causarem sepse grave e choque séptico pode estar relacionada ao modo como elas conseguem entrar na corrente sanguínea. Há três possíveis rotas: o movimento através da barreira epitelial intacta, o movimento através de epitélios danificados e o movimento dos sítios extra vasculares de infecção ou inflamação. Em cada instância, bactérias podem entrar no sangue através de vasos venosos ou canais linfáticos (revisado por MUNFORD, 2006).

Existem duas teorias de como as bactérias promoveriam a inflamação e infecção sistêmica. Uma delas trata da possibilidade das bactérias gram-negativas resistirem às defesas locais (foco infeccioso) do hospedeiro e conseguirem atingir a circulação sanguínea. Desta forma, os produtos bacterianos (LPS) das bactérias gram-negativas ativam leucócitos, plaquetas e células endoteliais, e assim estas respostas induzem a inflamação sistêmica (aumento de permeabilidade vascular, ativação do sistema complemento e cascata de coagulação, adesão leucócito-endotélio) (revisado por COHEN, 2002; revisado por HOTCHKISS; KARL, 2003; CURRY; ADAMSON, 2013). A segunda teoria sugere que as bactérias iniciam a inflamação principalmente por infectar outros tecidos e assim contribuir para disfunção de múltiplos órgãos. Portanto, bactérias circulantes ou endotoxina não necessariamente seriam estímulos diretos na inflamação intravascular, uma vez que a inflamação é acionada no tecido infectado e não no sangue (MUNFORD; PUGIN, 2001; MUNFORD, 2006).

Neste modelo de pneumosepse, o órgão (ou compartimento) onde ocorreu a maior disseminação bacteriana foi o fígado (todos os tempos), seguido pelo rim (todos os tempos), plasma (principalmente 6 e 24 h), coração (principalmente 6 e 24 h) e cérebro (principalmente 6 e 24 h). A disseminação ocorreu de maneira generalizada, e este dado corrobora com a segunda teoria sobre promover a inflamação sistêmica, pois além de haver disseminação bacteriana, houve também produção de citocinas anti e pró-inflamatórias nos mesmos tecidos e compartimentos onde foi verificada a disseminação bacteriana.

Apenas parte dos pacientes com sepse e choque séptico apresentam bacteremia positiva. Entretanto, quando avalia-se as taxas de mortalidades entre os grupos com bacteremia positiva e negativa, verifica-se que não há diferenças (BRUN-BUISSON et al., 1997; YANG et al., 2013). Já foi demonstrado, porém, que a amplificação de DNA ribossomal 16S foi detectada em amostras de sangue de pacientes com cultura negativa (SLEIGH et al., 2001). Mas, independentemente de uma técnica demonstrar ou não se há bacteremia, esta informação não parece favorecer o prognóstico dos pacientes como mencionado anteriormente (dependendo do quadro do paciente), pois não há mortalidade reduzida devido à bacteremia negativa. Além do mais, quando há suspeita que o paciente esteja séptico, a equipe médica já inicia o tratamento com antibiótico como profilaxia para pacientes com neutropenia e com problemas respiratórios (MICEK et al., 2010; revisado por SCHORR et al., 2014). Quando o diagnóstico da sepse é efetuado adequadamente, sugere-se que o tratamento com antibiótico de amplo espectro seja realizado em até 1 hora após a sua identificação (DELLINGER et al., 2013).

Tanto os animais que apresentaram bacteremia negativa quanto positiva, demonstraram maior disseminação bacteriana no fígado em comparação com os demais tecidos observados. O fígado recebe cerca de 25% do débito cardíaco, principalmente através do leito vascular mesentérico, uma região sujeita à translocação bacteriana durante a sepse. Este tecido apresentou-se infectado em modelo de pneumonia somente 24 horas após a inoculação com a bactéria *Streptococcus pneumoniae* (BOER et al., 2014), porém deve-se considerar que não se trata de um modelo de sepse nem da mesma bactéria utilizada em nosso estudo.

As interações e sinalizações entre hepatócitos, células de Kupffer e células endoteliais dos capilares sinusóides hepáticas levam a respostas inflamatórias (mediadas por TNF- $\alpha$ , por exemplo) que são fundamentais para o "choque hepático" (revisado por TSIOTOU et al., 2005). Estudos recentes demonstram que a maioria dos macrófagos residentes em um tecido são diferenciados durante o desenvolvimento embrionário e podem persistir até seu estágio na vida adulta como resultado do seu longo tempo de vida e baixa taxa de proliferação local (revisado por GENTEK et al., 2014). Entretanto, isto depende especificamente do tecido onde os macrófagos residentes se apresentam. Em relação ao fígado, as células de Kupffer (macrófagos residentes do fígado) não apresentam hematopoiese adulta significativa (GOMEZ PERDIGUERO et al., 2014). Além disso, em algumas infecções como aquela induzida por *Listeria monocytogenes*, as células de Kupffer sofrem rápida necrose dentro de algumas horas após a infecção. Em decorrência desta morte celular local, monócitos podem ser recrutados para o tecido hepático para auxiliarem no *clearance* bacteriano (BLERIÓT et al., 2015). Se na infecção com *Klebsiella pneumonia* deste estudo as células de Kupffer sofrem algum dano funcional, pode haver recrutamento de monócitos, pois a proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) apresentou-se elevada a partir de 2 horas após a infecção e aumentou ainda mais com o passar do tempo, acompanhando, de certa forma, o perfil de disseminação bacteriana neste tecido.

Outro órgão bastante afetado pela disseminação bacteriana foi o rim, que apresentou número de bactérias significativamente elevado já 2 horas após a inoculação com a *K. pneumoniae*. A carga bacteriana permaneceu elevada também em 6 e 24 horas após a indução da pneumonia. Poucos estudos avaliam a disseminação bacteriana no rim durante a sepse em modelos experimentais e em pacientes sépticos. Em um estudo de caso de um paciente com infecção ocular por *K. pneumoniae*, foi verificado que ele apresentou um abscesso no rim, indicando que houve disseminação para este tecido (CHEN et al., 2010). Outra pesquisa, desta vez com o modelo de pneumonia induzida por *Staphylococcus aureus*, demonstrou haver translocação bacteriana para o rim 24 horas após a indução da infecção (HUA et al., 2014). Alterações na barreira de filtração glomerular nos rins foram observadas em um estudo, no qual o modelo utilizado foi o

CLP (ligadura e perfuração do ceco). Mais especificamente, foram observadas modificações moleculares no glicocálice desta estrutura renal, diminuição das concentrações de ácido siálico, sindecam-1 e ácido hialurônico já nas primeiras 3 horas após a indução da sepse (ADEMBRI et al., 2011). Os autores relacionaram tais alterações com o aumento da permeabilidade vascular observada no rim, demonstrando aumento das concentrações de albumina na urina, por exemplo. Diante destes dados, pode-se sugerir que além de proteínas plasmáticas de grande peso molecular, as bactérias possam também se translocar pela mesma via. Há poucos trabalhos a respeito da resposta imune do tecido renal na infecção. Entretanto, o epitélio tubular renal possui receptores do tipo *Toll* e, além disso, o tecido renal ainda apresenta células dendríticas e macrófagos residentes que auxiliam na defesa imune renal (JANG; HABB, 2014). Mesmo assim, boa parte das pesquisas apontam os neutrófilos como os responsáveis em fazer o *clearance* bacteriano nos rins (revisado por SVANBORG et al., 1999; CHOWDHURY et al., 2004; DISTLDORF et al., 2015). Os neutrófilos presentes no fígado podem interagir com plaquetas e contribuir para o *clearance* bacteriano neste órgão, por meio da formação de NETs (do inglês, *neutrophil extracellular traps*) (revisado por HICKEY; KUBES, 2009; SEMPLE et al., 2011), e podemos suspeitar que o mesmo ocorra no rim.

Geralmente, quando o rim do paciente séptico começa a falhar devido à inflamação sistêmica e situação hemodinâmica durante a sepse, há aumento dos riscos de mortalidade destes pacientes (BELLOMO et al., 2004). Além disso, pacientes que apresentam insuficiência renal aguda durante a sepse que sobrevivem apresentam baixa qualidade de vida e maior risco de morte até 10 anos após o episódio da sepse (SCHORTGEN; ASGAR, 2015). Esta baixa expectativa de vida pode ser decorrente de desenvolvimento da falência renal crônica nestes pacientes que apresentam complicações, principalmente decorrentes de eventos cardiovasculares (CHAWLA et al., 2014). Cerca de 50% dos pacientes sobreviventes apresentam a função renal comprometida (LINDER et al., 2014). Adicionalmente, pacientes e animais de experimentação que apresentam lesão renal aguda demonstram ser mais suscetíveis a disseminação bacteriana durante uma infecção (SINGBARTL et al., 2011).

Além do tecido renal e hepático, os pacientes sépticos podem apresentar cardiomiopatia séptica. A disfunção do tecido cardíaco está entre as principais causas de óbito de pacientes com sepse grave e choque séptico (KUMAR et al., 2011). A partir de 2 horas, alguns animais já apresentaram disseminação bacteriana no coração, porém em 6 e 24 horas (após a inoculação) a disseminação se tornou mais evidente. Segundo Beaufort e colaboradores (2011), as bactérias que alcançam o coração e estabelecem-se neste tecido, promovem dano tecidual por meio da liberação de proteases próprias. Além disso, ocorre também a formação de NETs no tecido cardíaco, a qual favorece ainda mais o dano tecidual neste local pela liberação de outras proteases produzidas pelos neutrófilos infiltrados (BRINKMAN et al., 2004; FONTAINE et al., 2004; AUGUST et al., 2013). Desta forma, pode-se inferir que tanto a resposta microbiana quanto a resposta imune do hospedeiro contribuem para a lesão tecidual cardíaca que, por sua, vez diminui o funcionamento adequado do coração.

Além dos órgãos mencionados até o momento, o cérebro pode ser prejudicado também durante o processo da sepse. Os pacientes sépticos possuem alto risco de desenvolverem disfunção de múltiplos órgãos e mais de 70% dos pacientes diagnosticados com sepse demonstram disfunção cerebral, a qual pode ser associada com diminuição da cognição a longo prazo (GIRARD et al., 2010; IWASHYNA et al., 2010). Há um caso clínico que descreve um paciente com pneumonia provocada por *Klebsiella pneumoniae* e que apresenta encefalite secundária à pneumonia (OHTA et al., 2013). No modelo utilizado de pneumosepse induzido por inoculação de *Klebsiella pneumoniae*, foi demonstrado disseminação bacteriana para o cérebro em todos os tempos avaliados (principalmente, 6 e 24 h após a infecção).

Bitsch e colaboradores (1996) estudaram 30 registros médicos de pacientes que apresentaram encefalite séptica secundária à infecção no coração. Todos os pacientes apresentaram inflamação tecidual e infarto hemorrágico (imagens obtidas por tomografia computadorizada) e alguns pacientes apresentaram abscessos cerebrais. Um caso de paciente com infecção primária no fígado (por *Klebsiella pneumoniae*) foi relatado por Wipfler e colaboradores (2008). Este paciente foi internado com sinais e sintomas de acidente vascular cerebral, confirmados por exames de imagens. A cultura bacteriana no fluido cérebro-espinhal mostrou contaminação por *Klebsiella*

*pneumonia* e, após o tratamento com o antibiótico, as lesões cerebrais foram diminuindo com o tempo. Os autores sugerem que a lesão cerebral foi provocada muito possivelmente por disseminação bacteriana neste tecido, associada à trombocitopenia apresentada pelo paciente. Vale lembrar que neste estudo os animais, além de apresentarem disseminação da infecção no cérebro, também demonstraram baixos níveis de plaquetas circulantes, corroborando as observações realizadas no estudo de caso mencionado.

O número de plaquetas apresentou-se reduzido a partir de 2 horas após a infecção, diminuindo progressivamente até 24 horas. O decréscimo das concentrações de plaquetas está associado, proporcionalmente, com a diminuição da resposta imune do hospedeiro durante a sepse induzida por *Klebsiella pneumoniae* em camundongos (De STOPPELAAR et al., 2014). Pacientes com trombocitopenia permanecem nas unidades de terapia intensiva durante períodos maiores e apresentam maior mortalidade. A causa da baixa contagem de plaquetas pode ser devido a hemorragias ou coagulação intravascular disseminada durante a sepse (VINCENT et al., 2002; LEVI et al., 2008). Apesar da diminuição do número de plaquetas, o número de neutrófilos aumentou significativamente 24 horas após a indução da pneumosepse. O aumento de neutrófilos é observado na maioria dos pacientes sépticos e, possivelmente, participa da disfunção de órgãos, pois os mesmos podem migrar para os tecidos e liberar enzimas proteolíticas que contribuem para o dano tecidual (BROWN; TREACHER, 2006). Adicionalmente, os neutrófilos ativados durante o quadro séptico liberam citocinas e outros mediadores inflamatórios, por meio do reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos via receptor do tipo *Toll*. Após a ativação destes receptores, estas células podem liberar citocinas pró e anti-inflamatórias que, por sua vez, podem recrutar e ativar outras células do sistema imune adaptativo (LACY; STOW, 2011).

As concentrações plasmáticas de citocinas, há muito tempo, são relacionadas com a gravidade da sepse (DAMAS et al., 1989). A partir da década de 80, muitos estudos clínicos e experimentais utilizaram as suas respectivas mensurações para traçarem correlações com diagnóstico, prognóstico, disfunção de órgãos e mortalidade (WAAGE et al., 1986; DAMAS et al., 1989; MICHIE et al., 1988; BOZZA et al., 2007; Van Der BERG et al., 2013). No

presente estudo foi observado que, a partir de 2 horas, as citocinas plasmáticas avaliadas (TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-10 e IL-6) mostraram-se elevadas quando comparadas com as concentrações detectadas no grupo controle (falso-inoculado). Sordi et al. (2013a) demonstraram que os animais com sepse induzida por *Klebsiella pneumoniae* apresentaram aumento de TNF- $\alpha$  no plasma, somente 24 horas após a inoculação. Em contrapartida, outro estudo, utilizando a mesma bactéria em camundongos *Balb-C*, mostrou aumento discreto de IL-6 e TNF- $\alpha$  plasmáticos 2 horas após a inoculação (RUKAVINA et al., 2005). A maioria das pesquisas com sepse mensuram as citocinas em momentos mais tardios da infecção (BOZZA et al., 2007; SORDI et al., 2013a; KANER et al., 2014; ZHAO et al., 2014). Considerando que os níveis de citocinas plasmáticos e pulmonares aumentam rapidamente, até mesmo apenas 2 horas após a infecção, tais informações podem ser relevantes para os pesquisadores que estudam a cinética da resposta imune à sepse. A mensuração de citocinas em momentos tão precoces da sepse é pouco comum e menos ainda se sabe sobre a produção de citocinas em demais tecidos, ao longo do tempo.

O passo seguinte deste estudo foi avaliar se nos mesmos órgãos afetados pela disseminação bacteriana apresentam alteração na produção de citocinas teciduais. Sendo assim, as citocinas TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-10 e IL-6 foram mensuradas a partir de tecidos coletados de animais controle (falso-inoculados) e animais com pneumosepse. A coleta de tecidos de animais sépticos foi restrita somente àqueles que apresentaram escores clínicos  $\geq 3$ , pois estes animais apresentam maiores chances de morrer em decorrência da sepse, além de apresentarem maior disseminação bacteriana. Muitos estudos que apresentam dados acerca de citocinas relacionadas a infecções pulmonares utilizam amostras de lavado bronco-alveolar, as quais corresponderiam à produção de citocinas no pulmão (SORDI et al., 2013a; LORENZO et al., 2015; MELITON et al., 2015). Entretanto, decidiu-se avaliar as concentrações de citocinas no foco infeccioso e, mesmo após a perfusão e exsanguinação do animal, as citocinas apresentaram-se aumentadas a partir de 2 horas após a inoculação com *Klebsiella pneumoniae*, assim como havia sido observado no plasma. Em um trabalho realizado por Hilliard et al. (2011), foi demonstrado aumento das concentrações de IL-6 nos pulmões somente a partir de 4,5 horas após a indução de sepse

por pneumonia em camundongos, atingindo concentrações máximas em 24 horas. As concentrações de IL-6 no plasma apresentaram aumento maior, a partir de 7,5 horas após a inoculação. Neste mesmo estudo, as concentrações de IL-10 tanto no plasma, quanto no pulmão não aumentaram em nenhum tempo observado (3 h – 24 h). Entretanto, nossos resultados mostram aumento significativo da citocina IL-10 a partir de 2 horas após a inoculação. Em um estudo realizado em 1996, por Greenberger et al., mostrou-se que a neutralização da IL-10 melhorou o *clearance* bacteriano e aumentou as taxas de sobrevivência, sugerindo que a presença de IL-10 prejudica a defesa do hospedeiro. Como estas amostras (tecidos) foram avaliadas a partir de animais que apresentam alta probabilidade de morte pela sepse, podemos sugerir que este aumento dos níveis plasmáticos de IL-10 possa contribuir com o agravamento do quadro dos animais sépticos.

Como já citado anteriormente, parte dos pacientes sépticos desenvolvem cardiomiopatia secundária à sepse. Uma das contribuições para este dano cardíaco pode ser o aumento de citocinas circulantes ou no coração. Algumas citocinas, como TNF- $\alpha$  e IL-6, importantes na inflamação sistêmica e local (tecido cardíaco), já foram identificadas em miócitos cardíacos (MERX; WEBBER, 2007). Horton e colaboradores (2006) demonstraram que miócitos cardíacos isolados de camundongos sépticos (modelo de pneumosepse com *K. pneumoniae*) secretam citocinas como TNF, IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-10, 24 horas após a pneumosepse. Citocinas, como TNF, já foram demonstradas como causadoras da diminuição da contração de miócitos cardíacos em experimentos *in vitro* e *in vivo* (NATANSON et al., 1989; GOLDBERGER et al., 1996). Desta forma, TNF e as demais citocinas avaliadas podem favorecer a inflamação localizada neste tecido. Adicionalmente, nossos dados ainda mostram a produção de citocinas em momentos iniciais da sepse, além de 24 horas após a inoculação, como descrito anteriormente.

Outro órgão muito importante no quadro séptico é o rim, que, além de apresentar acentuada disseminação bacteriana, também apresentou elevados níveis de citocinas teciduais. A partir de 2 horas após a indução da pneumosepse, foi verificado aumento das concentrações das citocinas pró-inflamatórias TNF, MCP-1 e IL-6. Já a citocina anti-inflamatória IL-10 foi detectada em níveis baixos que não diferiram estatisticamente quando comparados aos do grupo controle (falso-inoculado). O tecido renal possui poucos



macrófagos residentes, porém esses podem liberar citocinas e contribuir para a defesa e inflamação renal (YSEBAERT et al., 2000). Além disso, células dendríticas residentes já demonstraram liberar TNF em modelo de isquemia renal (DONG et al., 2007). Porém, os neutrófilos ainda são as células mais estudadas em pesquisas envolvendo o tecido renal e respectivas patologias, os quais se infiltram no rim e também contribuem para a produção de citocinas neste tecido (TITTEL et al., 2007; JANG; HABB, 2014). As células endoteliais e tubulares renais também são capazes de produzir citocinas. A produção de moléculas pró-inflamatórias liberadas por estas células contribuem para a lesão renal aguda (THURMAN et al., 2007), porém tais informações são de estudos relacionados a lesões não infecciosas. Resumidamente, as células que constituem os rim são capazes de produzir as seguintes citocinas: TNF, MCP-1, IL-8, IL-18 e IL-6 (considerado biomarcador de lesão renal aguda), entre outras (AKCAY et al., 2009). A lesão renal aguda é uma disfunção orgânica muito comum durante a sepse. Citocinas como TNF, IL-6, IL-10 e MCP-1 podem iniciar uma variedade de sinalizações que afetam o funcionamento renal. As concentrações das citocinas plasmáticas citadas acima foram relacionadas com marcadores de lesão renal como ureia e creatinina em modelos de CLP. A partir de 6 horas, as concentrações de citocinas se elevam, mas somente em 24 horas os marcadores de dano renal apresentam-se elevados (OTTO et al., 2013). A discussão dos autores trata justamente da questão destas citocinas promoverem a lesão renal aguda. Sendo assim, se as citocinas circulantes podem ser prejudiciais ao tecido renal, muito provavelmente as altas concentrações das citocinas do tecido renal detectadas em nossos estudos, podem contribuir também para o mal funcionamento do rim. Foram mensurados os mesmos marcadores citados neste estudo, porém isto será abordado mais adiante.

Assim como o rim, o fígado é outro tecido muito afetado na sepse. A disfunção hepática é observada em aproximadamente 40% dos pacientes sépticos, e essa disfunção envolve a participação de várias células do fígado, como as células de Kupffer, hepatócitos e células endoteliais dos capilares sinusóides (WANG et al., 2014). As células de Kupffer modulam a resposta imune e inflamatória por meio da liberação de citocinas, além de realizarem a fagocitose, apresentação de antígenos e de combate aos radicais livres que ocorrem durante alguma inflamação

(revisado por WINWOOD; ARTHUR, 1993; revisado por MALIK et al., 2002). As células endoteliais sinusoidais também colaboram com a resposta imune local por meio da liberação de citocinas (KNOLLE et al., 1997). De modo geral, a abordagem de mensurar citocinas em diferentes tecidos durante a sepse é incomum, porém em um trabalho realizado com o modelo de sepse (injeção intravenosa de *K. pneumoniae*) quantificou por RNAm, as citocinas TNF, MCP-1 e KC (citocina derivada de queratinócitos) foram detectadas em 1, 3 e 6 horas após indução da infecção (COGEN; MOORE, 2008). Os nossos resultados mostram aumento das concentrações de TNF, MCP-1 e IL-10 principalmente 2 e 6 horas após a inoculação bacteriana. Entretanto, a IL-6 mostrou-se elevada em todos os tempos observados (2, 6 e 24 h). Sendo assim, os resultados obtidos em nosso estudo corroboram os dados do último trabalho mencionado, além de ampliar o conhecimento relativo aos órgãos e tempos observados em nosso modelo de pneumosepse.

Além das células hepáticas participarem efetivamente da inflamação local, há ainda a infiltração de neutrófilos para o fígado. Este neutrófilos infiltrados ainda são capazes de produzir citocinas e contribuir para o dano tecidual observado na sepse (DIAO et al., 2010). Detalhes precisos sobre a base celular da disfunção hepática ainda são desconhecidos e suas consequências ainda permanecem incompreendidas (WANG et al., 2014). Contudo, podemos supor que boa parte das citocinas analisadas em nosso estudo, possa contribuir direta ou indiretamente para a lesão deste tecido.

Como já mencionado anteriormente, alguns pacientes que apresentam infecção no sistema nervoso central demonstram alguns sinais clínicos de lesão cerebral. Parte destes feitos pode ser explicado pelo estado inflamatório local observado neste tecido. Citocinas são moléculas que contribuem bastante para sinalização celular desta comunicação infecção/inflamação entre células do hospedeiro e patógeno, e provavelmente citocinas liberadas neste tecido podem contribuir para sintomas deletérios observados em pacientes sépticos. Tanto a micróglia quanto os macrófagos que se infiltram no tecido cerebral são capazes de produzir citocinas (MICHEL et al., 2014). As citocinas podem desestabilizar a barreira hematoencefálica e permitir maior infiltração de bactérias e células do sistema imune. Há, porém, a visão tradicional que aceita a teoria de que a síndrome da resposta

inflamatória sistêmica possa auxiliar na disfunção celular da barreira hematoencefálica, e assim moléculas pró-inflamatórias circulantes podem atingir o sistema nervoso central e favorecer a inflamação local (BIFF et al., 2013). Já foram identificados vários receptores para citocinas em diferentes tipos celulares do sistema nervoso central. Receptores para IL-6, IL-10 e TNF podem ser encontrados em neurônios, astrócitos e micróglia (revisado por STERNBERG, 1997). Sendo assim, a lesão cerebral pode ser provocada também pela ação de citocinas localmente produzidas.

Em um estudo utilizando o modelo de meningite com a bactéria *K. pneumoniae*, foram observadas maiores concentrações de citocinas (TNF, IL-1 e IL-6) no líquido de ratos infectados, quando comparadas com as concentrações plasmáticas (WEN et al., 2007). O modelo estudado neste trabalho não é de pneumonia, porém a infecção localizada no cérebro pode ter contribuído para este perfil inflamatório no sistema nervoso central, com maiores níveis de citocinas no fluido cerebrospinal do que no plasma. Entretanto, no presente estudo, verificou-se um aumento significativo no cérebro somente de IL-6, 24 horas após a inoculação bacteriana (modelo de pneumonia). Já no estudo citado, as citocinas mostraram-se elevadas a partir de 2 horas após a infecção. Ainda sobre o estudo de Wen et al. (2007), pacientes com suspeita de infecção no sistema nervoso central foram submetidos à coleta de líquido para confirmação de infecção. Dos 14 pacientes avaliados com cultura bacteriana positiva, 4 deles apresentaram *K. pneumoniae*, e destes, 3 morreram e um sofreu sequelas neurológicas. Todos esses 4 pacientes apresentaram, contagens elevadas de leucócitos no líquido, além de grande concentração de citocinas no líquido.

Resumidamente, verificou-se que os órgãos que apresentam disseminação bacteriana também apresentam aumento dos níveis de citocinas. Estas informações sugerem que as citocinas podem ser produzidas por células residentes dos respectivos órgãos e contribuir para pelo menos parte, da diminuição da função tecidual. Além disso, pode haver concomitantemente infiltração de neutrófilos e macrófagos para estes tecidos e produção de citocinas por estas células, como já demonstrado por vários autores. Todavia, a maioria dos estudos relacionados com a participação de citocinas mensuram as mesmas somente no plasma, mesmo aqueles estudos que utilizam modelos animais, de modo que pouco se sabe sobre a

real participação destas moléculas pró-inflamatórias, localmente e como que ocorre a perda de função destes tecidos.

As concentrações excessivas de citocinas circulantes podem estar correlacionadas com a disfunção de múltiplos órgãos (PINSKY et al., 1993; PETTILA, 2002; CHO; CHOI, 2014). Todavia, outros candidatos já foram levantados como responsáveis pela disfunção tecidual como a disfunção endotelial (BOISRAMÉ-HELMS et al., 2013), disfunção mitocondrial (FULLERTON; SINGER, 2011; ZHANG, 2012) e diminuição da perfusão tecidual que resulta em hipóxia/isquemia tecidual (RAMIREZ et al., 2013; De BACKER et al., 2014). Estes estudos mencionados não excluem a participação das citocinas nas disfunções mencionadas.

Como foi verificado, tanto o rim quanto o fígado apresentaram concentrações elevadas de bactérias e citocinas, o que pode sugerir que nestes órgãos as bactérias foram capazes de ativar as células residentes e estimulá-las a produzirem citocinas. Em contrapartida, estas citocinas liberadas localmente podem ter contribuído para o aumento da lesão renal (ureia e creatinina) e hepática (ALT e AST), uma vez que os marcadores de lesão renal e hepático se mostraram elevados, principalmente, 24 horas após a indução da pneumosepse. Mesmo não se tendo certeza, mas diante destes resultados (aumento de disseminação bacteriana, citocinas), aparentemente parte da resposta imune local destes tecidos foi afetada. Encontram-se poucos trabalhos na literatura mais detalhados a respeito da relação às bactérias, às citocinas e ao dano de órgãos.

Assim sendo, podemos questionar o nosso conhecimento a respeito da síndrome da resposta inflamatória sistêmica decorrente da sepse. A maioria dos estudos avaliam pouco a disseminação bacteriana, de modo que pouco se sabe sobre o perfil de disseminação de diferentes microrganismos ao longo do tempo e menos ainda se sabe sobre o perfil da produção de citocinas por células residentes de diferentes tecidos afetados na sepse. Uma análise importante que realizamos foi verificar uma forte correlação entre disseminação bacteriana por vários tecidos e escores clínicos (preditores de mortalidade), e destes mesmos tecidos conferimos a produção de diferentes citocinas. Os escores clínicos podem ser reflexos do que esteja ocorrendo em cada órgão do animal com pneumosepse, o que leva a pensar que as infecções e inflamações localizadas destes animais podem iniciar

uma síndrome da resposta inflamatória localizada (LIRS, *localized inflammatory response syndrome*). A inflamação localizada pode ser decorrente de uma paralização da resposta imune tecidual que permite a entrada de bactérias e falência de fagocitose nos tecidos e, conseqüentemente, o aumento de expressão e/ou liberação de moléculas inflamatórias, como citocinas, proteínas de adesão, óxido nítrico, enzimas proteolíticas etc.

Acreditamos que a disfunção de múltiplos órgãos na sepse ou falência de determinado tecido possa ocorrer devido a um somatório de fatores, como hipoperfusão tecidual e disfunção mitocondrial (como já demonstrado na literatura). Entretanto, pode-se sugerir a inserção da inflamação localizada também como fator responsável pela perda da função tecidual. Desta forma, o cenário que observamos durante a pneumosepse, nada mais é do que o somatório de inflamações locais que em conjunto, prejudicam o organismo como um todo. Esta proposição parece relevante, pois, se isto for verdade, o tratamento mais racional da sepse deve levar em consideração a inflamação que ocorre de dentro para fora (inflamação tecidual decorrente da disseminação bacteriana e produção de citocinas) e não somente de fora para dentro (toxinas bacterianas e citocinas circulantes que perfundem os tecidos).



## 5 CONCLUSÃO

As principais contribuições do presente estudo são: i) a avaliação dos escores clínicos em modelo de sepse experimental mostra correlações interessantes com a predição de mortalidade e infecção; ii) a demonstração do perfil bacteriano e de citocinas em diferentes órgãos (coração, cérebro, rim, fígado, plasma e pulmão) ao longo da infecção causada por *K. pneumoniae*; iii) órgãos comumente afetados pela sepse apresentam significativa disseminação bacteriana e produção de grandes níveis de citocinas e inflamação local, de tal forma que a disfunção de múltiplos órgãos deva ser a causa e não consequência da síndrome da respostas inflamatória sistêmica.





## **6 PERSPECTIVAS**

Com os resultados obtidos neste estudo, pode-se sugerir a utilização dos escores clínicos durante a sepse experimental induzida por pneumonia no grupo de pesquisa em que esta tese foi realizada como medida de avaliação de predição de mortalidade.

A existência da correlação entre o escore clínico com disseminação bacteriana pode contribuir para um melhor entendimento do quadro séptico e suas manifestações clínicas em animais de experimentação e em seres humanos em estudos futuros.

Como vários tecidos observados neste estudo apresentaram perfil inflamatório bastante relevante (alta produção de citocinas teciduais), a inflamação destes tecidos pode contribuir para a disfunção de múltiplos órgãos. Esta informação pode auxiliar futuros projetos que visem compreender o gatilho para alguns tecidos pararem de funcionar e isto contribuir para a piora do quadro clínico.



## REFERÊNCIAS

ADEMBRI, C.; SGAMBATI, E.; VITALI, L.; SELMI, V.; MARGHERI, M.; TANI, A.; BONACCINI, L.; NOSI, D.; CALDINI, A. L.; FORMIGLI, L.; DE GAUDIO, A. R. Sepsis induces albuminuria and alterations in the glomerular filtration barrier: a morphofunctional study in the rat. In: **Critical Care**, v. 15, n. 6, p. 277, 2011.

AIKAWA, N. Cytokine storm in the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome associated with surgical insults. In: **Nihon Geka Gakkai Zasshi**, v. 97, n. 9, p. 771-7, Review, set. 1996.

AKCAY, A.; NGUYEN, Q.; EDELSTEIN, C. L. Mediators of inflammation in acute kidney injury. In: **Mediators Inflammation**, v. 2009, p. 137072, 2009.

AKIRA, S.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Interleukin-6 in biology and medicine. In: **Advances Immunology**, v. 54, p. 1, 1993.

ALBERTI, C. et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. In: **Intensive Care Medicine**, v. 28, n. 2, p. 108-21, 2002.

AMANO, H.; MORIMOTO, K.; SENBA, M.; WANG, H.; ISHIDA, Y.; KUMATORI, A.; YOSHIMINE, H.; OISHI, K.; MUKAIDA, N.; NAGATAKE, T. Essential contribution of monocyte chemoattractant protein-1/C-C chemokine ligand-2 to resolution and repair processes in acute bacterial pneumonia. In: **Journal of Immunology**, v. 172, n. 1, p. 398-409, jan. 2004.

ANGUS, D. C.; WAX, R. S. Epidemiology of sepsis: an update. In: **Critical Care Medicine**, v. 29, n. 7, p. 109-16, 2001.

AUGUSTIN, P.; ALSALIH, G.; LAUNEY, Y.; DELBOSC, S.; LOUEDEC, L.; OLLIVIER, V.; CHAU, F.; MONTRAVERS, P.; DUVAL, X.; MICHEL, J. B.; MEILHAC, O. Predominant role of host proteases in myocardial damage associated with infectious endocarditis induced by *Enterococcus faecalis* in a rat model. In: **Infection and Immunity**, v. 81, n. 5, p. 1721-9, maio 2013.

BARKHAUSEN, T.; TSCHERNIG, T.; ROSENSTIEL, P.; VAN GRIENSVEN, M.; VONBERG, R. P.; DORSCH, M.; MUELLER-HEINE, A.; CHALARIS, A.; SCHELLER, J.; ROSE-JOHN, S.; SEEGER, D.; KRETTEK, C.; WAETZIG, G. H. Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model. In: **Critical Care Medicine**, v. 39, n. 6, p. 1407-13, 2011.

BEAUFORT, N.; CORVAZIER, E.; HERVIEU, A.; CHOQUEUX, C.; DUSSIOT, M.; LOUEDEC, L.; CADY, A.; DE BENTZMANN, S.; MICHEL, J. B.; PIDARD, D. The thermolysin-like metalloproteinase and virulence factor LasB from pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* induces anoikis of human vascular cells. In: **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 8, p. 1149-67, ago. 2011.

BEAULIEU, L. M.; FREEDMAN, J. E. Inflammation & the platelet histone trap. In: **Blood**, v. 118, n. 7, p. 1714-15, 2011.

BELLOMO, R.; RONCO, C.; KELLUM, J. A.; MEHTA, R. L.; PALEVSKY, P. Acute Dialysis Quality Initiative workgroup. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: The Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. In: **Critical Care**, v. 8, n. 4, p. 204-12, ago. 2004. Epub 2004 May 24. Review.

BEUTLER, B.; GREENWALD, D.; HULMES, J. D.; CHANG, M.; PAN, Y. C.; MATHISON, J.; ULEVITCH, R.; CERAMI, A. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. In: **Nature**, v. 316, p. 552-54, 1985.

BEWICK, V.; CHEEK, L.; BALL, J. Statistics review 13: receiver operating characteristic curves. In: **Critical Care**, v. 8, n. 6, p. 508-12, dez. 2004.

BIFF, D.; PETRONILHO, F.; CONSTANTINO, L.; VUOLO, F.; ZAMORA-BERRIDI, G. J.; DALL'IGNA, D. M.; COMIM, C. M.; QUEVEDO, J.; KAPCZINSKI, F.; DAL-PIZZOL, F. Correlation of acute phase inflammatory and oxidative markers with long-term cognitive impairment in sepsis survivors rats. In: **Shock**, v. 40, n. 1, p. 45-8, jul. 2013.

BITSCH, A.; NAU, R.; HILGERS, R. A.; VERHEGGEN, R.; WERNER, G.; PRANGE, H. W. Focal neurologic deficits in infective endocarditis and other septic diseases. In: **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 94, n. 4, p. 279-86, out. 1996.

BLAIR, P.; REX, S.; VITSEVA, O. et al. Stimulation of Toll-like receptor 2 in human platelets induces a thromboinflammatory response through activation of phosphoinositide3-kinase. In: **Circulation Research**, v. 104, n. 3, p. 346-54, 2009.

BLÉRIOT, C.; DUPUIS, T.; JOUVION, G.; EBERL, G.; DISSON, O.; LECUIT, M. Liver-resident macrophage necroptosis orchestrates type 1 microbicidal inflammation and type-2-mediated tissue repair during bacterial infection. In: **Immunity**, v. 42, n. 1, p. 145-58, jan. 2015.

BOISRAMÉ-HELMS, J.; KREMER, H.; SCHINI-KERTH, V.; MEZIANI, F. Endothelial dysfunction in sepsis. In: **Current Vascular Pharmacology**, v. 11, n. 2, p. 150-60, mar. 2013.

BONE, R. C.; BALK, R. A.; CERRA, F. B.; DELLINGER, R. P.; FEIN, A. M.; KNAUS, W. A.; SCHEIN, R. M.; SIBBALD, W. J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. In: American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. In: **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1644-55, jun. 1992. Review.

BONE, R. C.; BALK, R. A.; CERRA, F. B.; DELLINGER, R. P.; FEIN, A. M.; KNAUS, W. A.; SCHEIN, R. M.; SIBBALD, W. J.; ACCP/SCCM CONSENSUS CONFERENCE COMMITTEE. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine 1992. In: **Chest**, v. 136, Suppl 5, p. 28, nov. 2009.

BOSSINK, A. W.; PAEMEN, L.; JANSEN, P. M.; HACK, C. E.; THIJS, L. G.; VAN DAMME, J. Plasma levels of the chemokines monocyte chemoattractant proteins-1 and -2 are elevated in human sepsis. In: **Blood**, v. 86, n. 10, p. 3841-7, nov. 1995.

BOZZA, F. A.; SALLUH, J. I.; JAPIASSU, A. M.; SOARES, M.; ASSIS, E. F.; GOMES, R. N.; BOZZA, M. T.; CASTRO-FARIANETO, H. C.; BOZZA, P. T. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. In: **Critical Care**, v. 11, n. 2, p. 49, 2007.

BRANDT, C. T.; HOLM, D.; LIPROT, M.; OSTERGAARD, C.; LUNDGREN, J. D.; FRIMODT-MØLLER, N.; SKOVSTED, I. C.; ROWLAND, I. J. Impact of bacteremia on the pathogenesis of experimental pneumococcal meningitis. In: **Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 2, p. 235-44, jan. 2008.

BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; FAULER, B.; UHLEMANN, Y.; WEISS BROWN, K. A.; TREACHER, D. F. Neutrophils as potential therapeutic targets in sepsis. In: **Discovery Medicine**, v. 6, n. 33, p. 118-22, jun. 2006.

BRUN-BUISSON, C.; DOYON, F.; CARLET, J.; BEDOCK, B.; ANNONAY, C. H. et al. 1996. Bacteremia by Lomonosov Moscow State University on 01/07/14. For personal use only and severe sepsis in adults: a multicenter prospective survey in ICUs and wards of 24 hospitals. In: **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 154, p. 617-24, 1996.

CARSWELL, E. A.; OLD, L. J.; KASSEL, R. L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. In: **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, p. 3666–70, 1975.

CHACON-CABRERA, A.; ROJAS, Y.; MARTÍNEZ-CARO, L.; VILA-UBACH, M.; NIN, N.; FERRUELO, A.; ESTEBAN, A.; LORENTE, J. A.; BARREIRO E. Influence of mechanical ventilation and sepsis on redox balance in diaphragm, myocardium, limb muscles, and lungs. In: **Translational Research**, v. 164, n. 6, p. 477-95, dez. 2014.

CHAWLA, L. S.; EGGERS, P. W.; STAR, R. A.; KIMMEL, P. L. Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes. In: **The New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 1, p. 58-66, jul. 2014.

CHEN, K. J.; HWANG, Y. S.; WANG, N. K.; CHAO, A. N. Endogenous *Klebsiella pneumoniae* endophthalmitis with renal abscess: report of two cases. In: **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 429-32, maio 2010.

CHEN, Q., FISHER, D. T., CLANCY, K. A., GAUGUET, J. M., WANG, W. C., UNGER, E., ROSE-JOHN, S., VON ANDRIAN, U. H.; BAUMANN, H.; EVANS, S. S. Fever-range thermal stress promotes lymphocyte trafficking across high endothelial venules via an interleukin 6 trans-signaling mechanism. In: **Nature Immunology**, v. 7, p. 1299-1308, 2006.

CHICHE, L.; FOREL, J. M.; THOMAS, G.; FARNARIER, C.; VELY, F.; BLÉRY, M.; PAPAIZIAN, L.; VIVIER, E. The role of natural killer cells in sepsis. In: **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 986491, 2011. Review.

CHO, S. Y.; CHOI, J. H. Biomarkers of sepsis. In: **Infect Chemother**, v. 46, n. 1, p. 1-12, mar 2014.

CHOWDHURY, P.; SACKS, S. H.; SHEERIN, N. S. Minireview: functions of the renal tract epithelium in coordinating the innate immune response to infection. In: **Kidney Internacional**, v. 66, n. 4, p. 1334-44, out. 2004. Review.

COHEN, J.; CARLET, J. INTERSEPT: an international, multicenter, placebo-controlled trial of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor-alpha in patients with sepsis. International Sepsis Trial Study Group. In: **Critical Care Medicine**, v. 24, p. 1431-40, 1996.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. In: **Nature**, v. 420, p. 885-91, 2002.

COHEN, A. L.; MOORE, T. A. Beta2-microglobulin-dependent bacterial clearance and survival during murine *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. In: **Infection and Immunity**, v. 77, n. 1, p. 360-6, jan. 2009. Doi: 10.1128/IAI.00909-08. Epub 2008 Nov 3.

CURRY, F. R.; ADAMSON, R. H. Tonic regulation of vascular permeability. In: **Acta Physiologica**, v. 207, n. 4, p. 628-49, abr. 2013.

CYKTOR, J. C.; TURNER, J. Interleukin-10 and immunity against prokaryotic and eukaryotic intracellular pathogens. In: **Infection and Immunity**, v. 79, n. 8, p. 2964-73, ago. 2011. Review.

CZAIKOSKI, P. G.; NASCIMENTO, D. C.; SÔNEGO, F.; FREITAS, A.; TURATO, W. M.; CARVALHO, M. A.; SANTOS, R. S.; OLIVEIRA, G. P.; SANTOS SAMARY, C.; TEFE-SILVA, C.; ALVES-FILHO, J. C.; FERREIRA, S. H.; ROSSI, M. A.; ROCCO, P. R.; SPILLER, F.; CUNHA, F. Q. Heme oxygenase inhibition enhances neutrophil migration into the bronchoalveolar spaces and improves the outcome of murine pneumonia-induced sepsis. In: **Shock**, v. 39, n. 4, p. 389-96, abr. 2013.

DAMAS, P.; REUTER, A.; GYSEN, P.; DEMONTY, J.; LAMY, M.; FRANCHIMONT, P. Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans. In: **Critical Care Medicine**, v. 17, n. 10, p. 975-78, 1989.

DE BACKER, D.; ORBEGOZO CORTES, D.; DONADELLO, K.; VINCENT, J. L. Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock. In: **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 73-9, 2014.



DE BOER, J. D.; KAGER, L. M.; ROELOFS, J. J.; MEIJERS, J. C.; DE BOER, O. J.; WEILER, H.; ISERMANN, B.; VAN 'T VEER, C.; VAN DER POLL, T. Overexpression of activated protein C hampers bacterial dissemination during pneumococcal pneumonia. In: **BMC Infectious Diseases**, v. 14, p. 559, nov. 2014.

DE SIMONE, C.; CALDAROLA, G.; COCO, V.; PALUMBO, S.; POCINO, K.; SGAMBATO, A.; MAIORINO, A.; CORBI, M.; SANDRI, M. T.; VENDITTELLI, F.; CAPOLUONGO, E. Circulating endothelial cell levels in psoriatic patients and their modification after an anti-TNF-alpha (Etanercept) treatment. In: **Journal of the European Academy of Dermatology Venereology**, v. 28, n. 5, p. 590-96, 2014.

DE STOPPELAAR, S. F.; CLAUSHUIS, T. A.; JANSEN, M. P.; HOU B.; ROELOFS, J. J.; VAN'T VEER, C.; VAN DER POLL, T. The role of platelet MyD88 in host response during gram-negative sepsis. In: **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 13, n. 9, p. 1709-20, set. 2015.

DE STOPPELAAR, S. F.; VAN 'T VEER, C.; CLAUSHUIS, T. A.; ALBERSEN, B. J.; ROELOFS, J. J.; VAN DER POLL, T. Thrombocytopenia impairs host defense in gram-negative pneumonia-derived sepsis in mice. In: **Blood**, v. 124, n. 25, p. 3781-90, dez. 2014.

DELANGHE, J. R.; SPEECKAERT, M. M. Translational research and biomarkers in neonatal sepsis. In: **Clinica Chimica Acta**, fev. 2015. Review.

DELANO, M. J.; THAYER, T.; GABRILOVICH, S.; KELLY-SCUMPIA, K. M.; WINFIELD, R. D.; SCUMPIA, P. O.; CUENCA, A. G.; WARNER, E.; WALLET, S. M.; WALLET, M. A.; O'MALLEY, K. A.; RAMPHAL, R.; CLARE-SALZER, M.; EFRON, P. A.; MATHEWS, C. E.; MOLDAWER, L. L. Sepsis induces early alterations in innate immunity that impact mortality to secondary infection. In: **Journal of Immunology**, v. 186, n. 1, p. 195-202, jan. 2011.

DELLINGER, R. P.; LEVY, M. M.; CARLET, J. M.; BION, J.; PARKER, M. M.; JAESCHKE, R.; REINHART, K.; ANGUS, D. C.; BRUN-BUISSON, C.; BEALE, R.; CALANDRA, T.; DHAINAUT, J. F.; GERLACH, H.; HARVEY, M.; MARINI, J. J.; MARSHALL, J.; RANIERI, M.; RAMSAY, G.; SEVRANSKY, J.; THOMPSON, B. T.; TOWNSEND, S.; VENDER, J. S.; ZIMMERMAN, J. L.; VINCENT, J. L.; INTERNATIONAL SURVIVING SEPSIS CAMPAIGN GUIDELINES COMMITTEE; AMERICAN ASSOCIATION OF CRITICAL-CARE NURSES; AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS; AMERICAN COLLEGE OF EMERGENCY PHYSICIANS; CANADIAN CRITICAL CARE SOCIETY; EUROPEAN SOCIETY OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES; EUROPEAN SOCIETY OF INTENSIVE CARE MEDICINE; EUROPEAN RESPIRATORY SOCIETY; INTERNATIONAL SEPSIS FORUM; JAPANESE ASSOCIATION FOR ACUTE MEDICINE; JAPANESE SOCIETY OF INTENSIVE CARE MEDICINE; SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE; SOCIETY OF HOSPITAL MEDICINE; SURGICAL INFECTION SOCIETY; WORLD FEDERATION OF SOCIETIES OF INTENSIVE AND CRITICAL CARE MEDICINE. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. In: *Critical Care Medicine*, v. 36, n. 1, p. 296-327, jan. 2008. Erratum In: **Critical Care Medicine**, v. 36, n. 4, p. 1394-6, abr. 2008.

DELLINGER, R. P.; LEVY, M. M.; RHODES, A.; ANNANE, D.; GERLACH, H.; OPAL, S. M.; SEVRANSKY, J. E.; SPRUNG, C. L.; DOUGLAS, I. S.; JAESCHKE, R.; OSBORN, T. M.; NUNNALLY, M. E.; TOWNSEND, S. R.; REINHART, K.; KLEINPELL, R. M.; ANGUS, D. C.; DEUTSCHMAN, C. S.; MACHADO, F. R.; RUBENFELD, G. D.; WEBB, S.; BEALE, R. J.; VINCENT, J. L.; MORENO, R. Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including The Pediatric Subgroup. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. In: **Intensive Care Medicine**, v. 39, n. 2, p. 165-228, fev. 2013.

DEUTCHMAN, C. S.; TRACEY, K. J. Sepsis: current dogma and new perspectives. In: **Immunity**, v. 40, p. 463-75, 2014.

DIAO, L.; LI, N.; BRAYMAN, T. G.; HOTZ, K. J.; LAI, Y. Regulation of MRP2/ABCC2 and BSEP/ABCB11 expression in sandwich cultured human and rat hepatocytes exposed to inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$ . In: **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 41, p. 31185-92, out. 2010.

DINARELLO, C. A. A clinical perspective of IL-1 $\beta$  as the gatekeeper of inflammation. In: **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 5, p. 1203-17, 2011.

DINARELLO, C. A. Historical insights into cytokines. In: **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 1, p. 34-45, 2007.

DISTELDORF, E. M.; KREBS, C. F.; PAUST, H. J.; TURNER, J. E.; NOUAILLES, G.; TITTEL, A.; MEYER-SCHWESINGER, C.; STEGE, G.; BRIX, S.; VELDEN, J.; WIECH, T.; HELMCHEN, U.; STEINMETZ, O. M.; PETERS, A.; BENNSTEIN, S. B.; KAFFKE, A.; LLANTO, C.; LIRA, S. A.; MITTRÜCKER, H. W.; STAHL, R. A.; KURTS, C.; KAUFMANN, S. H.; PANZER, U. CXCL5 drives neutrophil recruitment in TH17-mediated GN. In: **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 26, n. 1, p. 55-6, jan. 2015.

DOMINITZKI, S.; FANTINI, M. C.; NEUFERT, C.; NIKOLAEV, A.; GALLE, P. R.; SCHELLER, J.; MONTELEONE, G.; ROSE-JOHN, S.; NEURATH, M. F.; BECKER, C. Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. In: **Journal of Immunology**, v. 179, n. 4, p. 2041-45, 2007.

DONG, X.; SWAMINATHAN, S.; BACHMAN, L. A.; CROATT, A. J.; NATH, K. A.; GRIFFIN, M. D. Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury. In: **Kidney International**, v. 71, n. 7, p. 619-28, abr. 2007.

DOWNIE, L.; ARMIENTO, R.; SUBHI, R.; KELLY, J.; CLIFFORD, V.; DUKE, T. Community-acquired neonatal and infant sepsis in developing countries: efficacy of WHO's currently recommended antibiotics: systematic review and meta-analysis. In: **Archives of Disease in Childhood**, v. 98, n. 2, p. 146-54, 2013.

DRECHSLER, S.; WEIXELBAUMER, K. M.; WEIDINGER, A.; RAEVEN, P.; KHADEM, A.; REDL, H.; VAN GRIENSVEN, M.; BAHRAMI, S.; REMICK, D.; KOZLOV, A.; OSUCHOWSKI, M. F. Why do they die? Comparison of selected aspects of organ injury and dysfunction in mice surviving and dying in acute abdominal sepsis. In: **Intensive Care Medicine Experimental**, v. 3, n. 1, p. 48, dez. 2015

BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; FAULER, B.; UHLEMANN, Y.; WEISS, D. S.; WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. In: **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532-5, mar. 2004.

DUELL, B. L.; TAN, C. K.; CAREY, A. J.; WU, F.; CRIPPS, A. W.; ULETT, G. C. Recent insights into microbial triggers of interleukin-10 production in the host and the impact on infectious disease pathogenesis. In: **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 295-313, abr. 2012.

EKANEY, M. L.; OTTO, G. P.; SOSSDORF, M.; SPONHOLZ, C.; BOEHRINGER, M.; LOESCHE, W.; RITTIRSCH, D.; WILHARM, A.; KURZAI, O.; BAUER, M.; CLAUS, R. A. Impact of plasma histones in human sepsis and their contribution to cellular injury and inflammation. In: **Critical Care**, v. 18, n. 5, p. 543, set. 2014.

ENGELBERTS, I.; VON ASMUTH, E. J.; VAN DER LINDEN, C. J.; BUURMAN, W. A. The interrelation between TNF, IL-6, and PAF secretion induced by LPS in an in vivo and in vitro murine model. In: **Lymphokine Cytokine Research**, v. 10, n. 1-2, p. 127-31, 1991.

FERREIRA, F. L.; BOTA, D. P.; BROSS, A.; MELOT, C.; VINCENT, J. L. Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. In: **JAMA**, v. 286, p. 1754-58, 2001.

FOELL, D.; WITTKOWSKI, H.; VOGL, T.; ROTH, J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. In: **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, p. 28-37, 2007.

FONTAINE, V.; TOUAT, Z.; MTAIRAG, E. L.; VRANCKX, M. R.; LOUEDEC, L.; HOUARD, X.; FUCHS, T. A.; BRILL, A.; DUERSCHMIED, D.; SCHATZBERG, D.; MONESTIER, M.; MYERS, D. D JR.; WROBLESKI, S. K.; WAKEFIELD, T. W.; HARTWIG, J. H.; WAGNER, D. D. Extracellular DNA traps promote thrombosis. In: **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 36, p. 15880-5, set. 2010.

FUJIWARA, Y.; KOBAYASHI, T.; CHAYAHARA, N.; IMAMURA, Y.; TOYODA, M.; KIYOTA, N.; MUKOHARA, T.; NISHIUMI, S.; AZUMA, T.; YOSHIDA, M.; MINAMI, H. Metabolomics evaluation of serum markers for cachexia and their intra-day variation in patients with advanced pancreatic cancer. In: **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. 113259, 2014.

FULLERTON, J. N.; SINGER, M. Organ failure in the ICU: cellular alterations. In: **Seminars in Respiratory Critical Care Medicine**, v. 32, p. 581-86, 2011.

GAULDIE, J.; RICHARDS, C.; NORTHEMANN, W.; FEY, G.; BAUMANN, H. IFN beta 2/BSF2/IL-6 is the monocyte-derived HSF that regulates receptor-specific acute phase gene regulation in hepatocytes. In: **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 557, p. 46-58, 1989.

GENTEK, R.; MOLAWI, K.; SIEWEKE, M. H. Tissue macrophage identity and self-renewal. In: **Immunology**, v. 262, n. 1, p. 56-73, nov. 2014. Review.

GIRARD, T. D.; JACKSON, J. C.; PANDHARIPANDE, P. P.; PUN, B. T.; THOMPSON, J. L.; SHINTANI, A. K.; GORDON, S. M.; CANONICO, A. E.; DITTUS, R. S.; BERNARD, G. R. et al. Delirium as a predictor of long-term cognitive impairment in survivors of critical illness. In: **Critical Care Medicine**, v. 38, p. 1513-520, 2010.

GOLDHABER, J. I.; KIM, K. H.; NATTERSON, P. D.; LAWRENCE, T.; YANG, P.; WEISS, J. N. Effects of TNF-alpha on  $[Ca^{2+}]_i$  and contractility in isolated adult rabbit ventricular myocytes. In: **American Journal of Physiology**, v. 271, p. 1449-55, 1996.

GOMEZ PERDIGUERO, E.; KLAPPROTH, K.; SCHULZ, C.; BUSCH, K.; AZZONI, E.; CROZET, L.; GARNER, H.; TROUILLET, C.; DE BRUIJN, M. F.; GEISSMANN, F.; RODEWALD, H. R. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. In: **Nature**, v. 518, n. 7540, p. 547-51, fev. 2015.

GREENBERGER, M. J.; STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L.; DANFORTH, J. M.; GOODMAN, R. E.; STANDIFORD, T. J. Neutralization of IL-10 increases survival in a murine model of *Klebsiella pneumoniae*. In: **Journal of Immunology**, v. 155, p. 722-9, 1995.

GREENBERGER, M. J.; STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L.; DANFORTH, J. M.; GOODMAN, R. E.; STANDIFORD, T. J.; HAMILTON, G.; HOFBAUER, S.; HAMILTON, B. Endotoxin, TNF-alpha, interleukin-6 and parameters of the cellular immune system in patients with intraabdominal sepsis. In: **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 24, n. 3, p. 361-68, 1992.

HANLEY, J. A.; MCNEIL, B. J. A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. In: **Radiology**, v. 148, n. 3, p. 839-43, set. 1983.

HEARD, S. O.; FINK, M. P. Multiple organ failure syndrome – Part I: Epidemiology, prognosis, and pathophysiology. In: **Intensive Care Medicine**, v. 6, p. 279-94, 1991.

HICKEY, M. J.; KUBES, P. Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels. In: **Nature Immunology**, v. 9, n. 5, p. 364-75, maio 2009. Review.

HILLIARD, J. J.; MELTON, J. L.; HALL, L.; ABBANAT, D.; FERNANDEZ, J.; WARD, C. K.; BUNTING, R. A.; BARRON, A.; LYNCH, A. S.; FLAMM, R. K. Comparative effects of carbapenems on bacterial load and host immune response in a *Klebsiella pneumoniae* murine pneumonia model. In: **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 836-44, fev. 2011.

HOREWICZ, V. V.; CRESTANI, S.; DE SORDI, R.; REZENDE, E.; ASSREUY, J. FPR2/ALX activation reverses LPS-induced vascular hyporeactivity in aorta and increases survival in a pneumosepsis model. In: **European Journal of Pharmacology**, v. 746, p. 267-73, jan. 2015.

HORTON, J.; MAASS, D.; WHITE, J.; SANDERS, B. Effect of aspiration pneumonia-induced sepsis on post-burn cardiac inflammation and function in mice. In: **Surgical Infections**, v. 7, n. 2, p. 123-35, abr. 2006.

HOTCHKISS, R. S.; KARL, I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. In: **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 2, p. 138-50, jan. 2003. Review.

HUA, L.; HILLIARD, J. J.; SHI, Y.; TKACZYK, C.; CHENG, L. I.; YU, X.; DATTA, V.; REN, S.; FENG, H.; ZINSOU, R.; KELLER, A.; O'DAY, T.; DU, Q.; CHENG, L.; DAMSCHRODER, M.; ROBBIE, G.; SUZICH, J.; STOVER, C. K.; SELLMAN, B. R. Assessment of an anti-alpha-toxin monoclonal antibody for prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* - induced pneumonia. In: **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 1108-17, 2014.

HUET, O.; RAMSEY, D.; MILJAVEC, S.; JENNEY, A.; AUBRON, C.; APRICO, A.; STEFANOVIC, N.; BALKAU, B.; HEAD, G. A.; DE HAAN, J. B.; CHIN-DUSTING, J. P. Ensuring animal welfare while meeting scientific aims using a murine pneumonia model of septic shock. In: **Shock**, v. 39, n. 6, p. 488-94, jun. 2013.

HWANG, S. Y.; LEE, J. H.; LEE, Y. H. et al. Comparison of the sequential organ failure assessment, acute physiology and chronic health evaluation II scoring system, and trauma and injury severity score method for predicting the outcomes of intensive care unit trauma patients. In: **American Journal of Emergency Medicine**, v. 30, n. 5, p. 749-53, 2012.

IJZERMAN, R. G.; VOORDOUW, J. J.; VAN WEISSENBRUCH, M. M.; YUDKIN, J. S.; SERNE, E. H.; DELEMARRE-VAN DE WAAL, H. A.; STEHOUWER C. D. TNF- $\alpha$  levels are associated with skin capillary recruitment in humans: a potential explanation for the relationship between TNF- $\alpha$  and insulin resistance. In: **Clinical Science**, v. 110, p. 361-368, 2006.

ILAS. INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE. **Campanha sobrevivendo à sepse**. Relatório nacional. 2004. Disponível em: <[http://www.ilas.org.br/upfiles/fckeditor/file/Relatorio\\_Nacional\\_de\\_z\\_2014\\_final.pdf](http://www.ilas.org.br/upfiles/fckeditor/file/Relatorio_Nacional_de_z_2014_final.pdf)>. Acesso em: 20 set. 2014.

ISHIBASHI, T.; KIMURA, H.; UCHIDA, T.; KARIYONE, S.; FRIESE, P.; BURSTEIN, S. A. Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro. In: **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, p. 5953-57, 1989.

IWASHYNA, T. J.; ELY, E. W.; SMITH, D. M.; LANGA, K. M. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. In: **JAMA**, v. 304, p. 1787-94, 2010.

JANG, H. R.; RABB, H. Immune cells in experimental acute kidney injury. In: **Nature Reviews Nephrology**, v. 11, n. 2, p. 88-101, fev. 2015.

JONES, A. E.; TRZECIAK, S.; KLINE, J. A. The Sequential Organ Failure Assessment score for predicting outcome in patients with severe sepsis and evidence of hypoperfusion at the time of emergency department presentation. In: **Critical Care Medicine**, v. 37, n. 5, p. 1649-54, maio 2009.

KANER, Z.; OCHAYON, D. E.; SHAHAF, G.; BARANOVSKI, B. M.; BAHAR, N.; MIZRAHI, M.; LEWIS, E. C. Acute phase protein  $\alpha$ 1-antitrypsin reduces the bacterial burden in mice by selective modulation of innate cell responses. In: **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 9, p. 1489-98, maio 2015.



KANG, S.; TANAKA, T.; KISHIMOTO, T. Therapeutic uses of anti-interleukin-6 receptor antibody. In: **International Immunology**, v. 27, n. 1, p. 21-9, 2015.

KAUKONEN, K. M.; BAILEY, M.; PILCHER, D.; COOPER, D. J.; BELLOMO, R. Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. In: **The New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 17, p. 1629-38, abr. 2015.

KISHIMOTO, T. Interleukin-6: from basic science to medicine - 40 years in immunology. In: **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 1, 2005.

KISHIMOTO, T.; AKIRA, S.; NARAZAKI, M.; TAGA, T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. In: **Blood**, v. 86, p. 1243-54, 1995.

KLOSTERHALFEN, B.; HÖRSTMANN-JUNGEMANN, K.; VOGEL, P.; DUFHUES, G.; SIMON, B.; KALFF, G.; KIRKPATRICK, C. J.; MITTERMAYER, C.; HEINRICH, P. C. Hemodynamic variables and plasma levels of PGI<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub> and IL-6 in a porcine model of recurrent endotoxemia. In: **Circulatory Shock**, v. 35, n. 4, p. 237-44, 1991.

KNOLLE, P. A.; LÖSER, E.; PROTZER, U.; DUCHMANN, R.; SCHMITT, E.; ZUM BÜSCHENFELDE, KH.; ROSE-JOHN, S.; GERKEN, G. Regulation of endotoxin-induced IL-6 production in liver sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells by IL-10. In: **Clinical & Experimental Immunology**, v. 107, n. 3, p. 555-61, mar. 1997.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. In: **International Reviews of Immunology**, v. 30, n. 1, p. 16-34, fev. 2011.

LACY, P.; STOW, J. L. Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. In: **Blood**, v. 118, n. 1, p. 9-18, jul. 2011.

LEON, L. R.; DINEEN, S.; BLAHA, M. D.; RODRIGUEZ-FERNANDEZ, M.; CLARKE, D. C. Attenuated thermoregulatory, metabolic, and liver acute phase protein response to heat stroke in TNF receptor knockout mice. In: **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 305, n. 12, p. 1421-32, 2013.

LEON, L. R.; WHITE, A. A.; KLUGER, M. J. Role of IL-6 and TNF in thermoregulation and survival during sepsis in mice. In: **American Journal of Physiology**, v. 275, p. 269-77, 1998.

LEVER, A.; MACKENZIE, I. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. In: *BMJ*, v. 335, n. 7625, p. 879-83, out. 2007. Review.

LEVI, M. The coagulant response in sepsis. In: **Clinical Chest Medicine**, v. 28, p. 627-42, 2008.

LEVY, M. M.; DELLINGER, R. P.; TOWNSEND, S. R.; LINDE-ZWIRBLE, W. T.; MARSHALL, J. C.; BION, J.; SCHORR, C.; ARTIGAS, A.; RAMSAY, G.; BEALE, R.; PARKER, M. M.; GERLACH, H.; REINHART, K.; SILVA, E.; HARVEY, M.; REGAN, S.; ANGUS, D. C.; SURVIVING SEPSIS CAMPAIGN. The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. In: **Critical Care Medicine**, v. 38, n. 2, p. 367-74, fev. 2010.

LEVY, M. M.; FINK, M. P.; MARSHALL, J. C.; ABRAHAM, E.; ANGUS, D.; COOK, D.; COHEN, J.; OPAL, S. M.; VINCENT, J. L.; RAMSAY, G; SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. In: **Critical Care Medicine**, v. 31, n. 4, p. 1250-6, abr. 2003, Review.

LI, Y.; WANG, Z.; M. A, X.; SHAO, B.; GAO, X.; ZHANG, B.; X. U, G.; WEI, Y. Low-dose cisplatin administration to septic mice improves bacterial clearance and programs peritoneal macrophage polarization to M1 phenotype. In: **Pathogens Disease**, v. 72, n. 2, p. 111-23, nov. 2014.

LILLEY, E.; ARMSTRONG, R.; CLARK, N.; GRAY, P.; HAWKINS, P.; MASON, K.; LÓPEZ-SALESANSKY, N.; STARK, A. K.; JACKSON, S. K.; THIEMERMANN C.; NANDI, M. Refinement of animal models of sepsis and septic shock. In: **Shock**, v. 43, n. 4, p. 304-16, abr. 2015.

LINDER, A.; FJELL, C.; LEVIN, A.; WALLEY, K. R.; RUSSELL, J. A.; BOYD, J. H. Small acute increases in serum creatinine are associated with decreased long-term survival in the critically ill. In: **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 189, n. 9, p. 1075-81, maio 2014.

LORD, J. M.; MIDWINTER, M. J.; CHEN, Y. F.; BELLI, A.; BROHI, K.; KOVACS, E. J.; KOENDERMAN, L.; KUBES, P.; LILFORD, R. J. The systemic immune response to trauma: an overview of pathophysiology and treatment. In: **Lancet**, v. 384, n. 9952, p. 1455-65, out. 2014. Review.

LORENZO, M. J.; MORET, I.; SARRIA, B.; CASES, E.; CORTIJO, J.; MÉNDEZ, R.; MOLINA, J.; GIMENO, A.; MENÉNDEZ, R. Lung inflammatory pattern and antibiotic treatment in pneumonia. In: **Respiratory Research**, v. 16, p. 15, fev. 2015.

LUSTER, A. D. Chemokines chemotactic cytokines that mediate inflammation. In: **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 7, p. 436-45, fev. 1998. Review.

LV, B.; HUANG, J.; YUAN, H.; YAN, W.; HU, G.; WANG J. Tumor necrosis factor- $\alpha$  as a diagnostic marker for neonatal sepsis: a meta-analysis. In: **Scientific World Journal**, v. 2014, p. 471463, 2014.

LV, S.; ZHAO, J.; ZHANG, J.; KWON, S.; HAN, M.; BIAN, R.; FU, H.; ZHANG, Y.; PAN, H. Tumor necrosis factor  $\alpha$  level in cerebrospinal fluid for bacterial and aseptic meningitis: a diagnostic meta-analysis. In: **European Journal of Neurology**, v. 21, n. 8, p. 1115-23, 2014.

MACHADO, G. B.; DE ASSIS, M. C.; LEÃO, R.; SALIBA, A. M.; SILVA, M. C.; SUASSUNA, J. H.; DE OLIVEIRA, A. V.; PLOTKOWSKI, M. C. ExoU-induced vascular hyperpermeability and platelet activation in the course of experimental *Pseudomonas aeruginosa* pneumosepsis. In: **Shock**, v. 33, n. 3, p. 315-21, mar. 2010.

MALIK, R.; SELDEN, C.; HODGSON, H. The role of non-parenchymal cells in liver growth. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 13, n. 6, p. 425-31, dez. 2002. Review.

MARCHANT, A.; DEVIÈRE, J.; BYL, B.; DE GROOTE, D.; VINCENT, J. L.; GOLDMAN, M. Interleukin-10 production during septicaemia. In: **Lancet**, v. 343, n. 8899, p. 707-8, 1994.

MARTINEZ, E. Z.; LOZADA-NETO, F.; PEREIRA, B. B. A curva ROC para testes diagnósticos. In: **Cadernos Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 11, p. 7-31, 2003.

MAYR, F. B.; YENDE, S.; ANGUS, D. C. Epidemiology of severe sepsis. In: **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 4-11, jan 2014. Review.

MCDONALD, A. P.; MEIER, T. R.; HAWLEY, A. E.; THIBERT, J. N.; FARRIS, D. M.; WROBLESKI, S. K.; HENKE, P. K.; WAKEFIELD, T. W.; MYERS, D. D. Jr. Aging is associated with impaired thrombus resolution in a mouse model of stasis induced thrombosis. In: **Thrombosis Research**, v. 125, n. 1, p. 72-8, 2010.

MEGE, J. L.; MEGHARI, S.; HONSTETTRE, A.; CAPO, C.; RAOULT, D. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. In: **Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 9, p. 557-69, set. 2006. Review.

MELITON, A. Y.; MENG, F.; TIAN, Y.; SARICH, N.; MUTLU, G. M.; BIRUKOVA, A. A.; BIRUKOV, K. G. Oxidized phospholipids protect against lung injury and endothelial barrier dysfunction caused by heat-inactivated *Staphylococcus aureus*. In: **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 308, n. 6, p. 550-62, mar. 2015.

MERX, M. W.; WEBER, C. Sepsis and the heart. In: **Circulation**, v. 116, n. 7, p. 793-802, ago. 2007. Review.

METNITZ, P. G.; MORENO, R. P.; ALMEIDA, E.; JORDAN, B.; BAUER, P.; CAMPOS, R. A.; IAPICHINO, G.; EDBROOKE, D.; CAPUZZO, M.; LE GALL, J. R.; SAPS 3 INVESTIGATORS. SAPS 3-From evaluation of the patient to evaluation of the intensive care unit. Part 1: objectives, methods and cohort description. In: **Intensive Care Medicine**, v. 31, n. 10, p. 1336-44, out. 2005.

MICEK, S. T.; WELCH, E. C.; KHAN, J.; PERVEZ, M.; DOHERTY, J. A.; REICHLEY, R. M.; KOLLEF, M. H. Empiric combination antibiotic therapy is associated with improved outcome against sepsis due to Gram-negative bacteria: a retrospective analysis. In: **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 5, p. 1742-8, maio 2010.

MICHELS, M.; DANIELSKI, L. G.; DAL-PIZZOL, F.; PETRONILHO, F. Neuroinflammation: microglial activation during sepsis. In: **Current Neurovascular Research**, v. 11, n. 3, p. 262-70, 2014. Review

MICHIE, H. R.; MANOGUE, K. R.; SPRIGGS, D. R.; REVHAUG, A.; O'DWYER, S.; DINARELLO, C. A.; CERAMI, A.; WOLFF, S. M.; WILMORE, D. W. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. In: **The New England Journal of Medicine**, v. 318, n. 23, p. 1481-6, jun. 1988.

MIZUKAMI, T.; KANAI, T.; MIKAMI, Y.; HAYASHI, A.; DOI, T.; HANDA, T.; MATSUMOTO, A.; JUN, L.; MATSUOKA, K.; SATO, T.; HISAMATSU, T.; HIBI, T. CCR9+ macrophages are required for eradication of peritoneal bacterial infections and prevention of polymicrobial sepsis. In: **Immunology**, v. 147, n. 1-2, p. 75-9, set. 2012.

MUNFORD, R. S.; PUGIN, J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. In: **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 163, p. 316-21, 2001.

MUNFORD, R. S. Severe sepsis and septic shock: the role of gram-negative bacteremia. In: **Annual Review Pathology**, v. 1, p. 467-96, 2006. Review.

MURET, J.; MARIE, C.; FITTING, C.; PAYEN, D.; CAVAILLON, J. M. Ex vivo T-lymphocyte derived cytokine production in SIRS patients is influenced by experimental procedures. In: **Shock**, v. 13, n. 3, p. 169-74, mar. 2000.

NAKANO, Y.; KASAHARA, T.; MUKAIDA, N.; KO, Y. C.; NAKANO, M.; MATSUSHIMA, K. Protection against lethal bacterial infection in mice by monocyte-chemotactic and -activating factor. In: **Infection and Immunity**, v. 62, p. 377-83, 1994.

NATANSON, C.; EICHENHOLZ, P. W.; DANNER, R. L. et al. Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock. In: **Journal of Experimental Medicine**, v. 169, p. 823-32, 1989.

NAWROTH, P. P.; STERN, D. M. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. In: **Journal of Experimental Medicine**, v. 163, p. 740-45, 1986.

NEMZEK, J. A.; XIAO, H. Y.; MINARD, A. E.; BOLGOS, G. L.; REMICK, D. G. Humane endpoints in shock research. In: **Shock**, v. 21, n. 1, p. 17-25, jan. 2004.

NOGUEIRA LDE, S.; SANTOS, M. R.; MATALOUN, S. E.; MOOCK M. Nursing Activities Score: comparison among the Index APACHE II and the mortality in patients admitted in intensive care unit. In: **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, n. 3, p. 327-30, set. 2007.

OHTA, M.; YONEDA, Y.; KITA, M.; ICHIKAWA, K.; KAGEYAMA, Y. Endogenous endophthalmitis and meningo-encephalitis in septic bacteremia of *Klebsiella pneumoniae*. In: **Rinsho Shinkeigaku**, v. 53, n. 1, p. 37-40, 2013.

OKADA, M.; KITAHARA, M.; KISHIMOTO, S.; MATSUDA, T.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells. In: **Journal of Immunology**, v. 141, p. 1543-49, 1988.

OPAL, S. M.; DELLINGER, R. P.; VINCENT, J. L.; MASUR, H.; ANGUS, D. C. The next generation of sepsis clinical trial designs: what is next after the demise of recombinant human activated protein C?\*. In: **Critical Care Medicine**, v. 42, n. 7, p. 1714-21, jul. 2014.

OPPERT, M.; ENGEL, C.; BRUNKHORST, F. M.; BOGATSCH, H.; REINHART, K.; FREI, U.; ECKARDT, K. U.; LOEFFLER, M.; JOHN, S. Acute renal failure in patients with severe sepsis and septic shock—a significant independent risk factor for mortality: results from the German Prevalence Study. In: **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 23, p. 904-9, 2008.

OTTO, G. P.; BUSCH, M.; SOSSDORF, M.; CLAUS, R. A. Impact of sepsis-associated cytokine storm on plasma NGAL during acute kidney injury in a model of polymicrobial sepsis. In: **Critical Care**, v. 17, n. 2, p. 419, mar 2003.

PARK, H.; PARK, S. G.; KIM, J.; KO, Y. G.; KIM S. Signaling pathways for TNF production induced by human aminoacyl-tRNA synthetase-associating factor. In: **Cytokine**, v. 20, p. 148-53, 2002.

PARLATO, M.; CAVAILLON, J. M. Host response biomarkers in the diagnosis of sepsis: a general overview. In: **Methods in Molecular Biology**, v. 1237, p. 149-211, 2015.

PASHMAKOVA, M. B.; BISHOP, M. A.; STEINER, J. M.; SUCHODOLSKI, J. S.; BARR, J. W. Evaluation of serum thyroid hormones in dogs with systemic inflammatory response syndrome or sepsis. In: **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care** (San Antonio), v. 24, n. 3, p. 264-71, maio-jun. 2014.

PEÑALOZA, H. F.; NIETO, P. A.; MUÑOZ-DURANGO, N.; SALAZAR-ECHEGARAI, F. J.; TORRES, J.; PARGA, M. J.; ALVAREZ-LOBOS, M.; RIEDEL, C. A.; KALERGIS, A. M.; BUENO, S. M. Interleukin-10 plays a key role in the modulation of neutrophils recruitment and lung inflammation during infection by *Streptococcus pneumoniae*. In: **Immunology**, v. 146, n. 1, p. 100-12, set. 2015.

PETTILÄ, V. Sequential assessment of multiple organ dysfunction as a predictor of outcome. In: **JAMA**, v. 287, n. 6, p. 713-4, fev. 2002.

PINSKY, M. R.; VINCENT, J. L.; DEVIERE, J.; ALEGRE, M.; KAHN, R. J.; DUPONT, E. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. In: **Chest**, v. 103, p. 565-75, 1993.

PLANQUETTE, B.; TIMSIT, J. F.; MISSET, B. Y.; SCHWEBEL, C.; AZOULAY, E.; ADRIE, C.; VESIN, A.; JAMALI, S.; ZAHAR, J. R.; ALLAOUCHICHE, B.; SOUWEINE, B.; DARMON, M.; DUMENIL, A. S.; GOLDGRAN-TOLEDANO, D.; MOURVILLIER, B. H.; BÉDOS, J. P.; OUTCOMEREA STUDY GROUP. *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia. Predictive factors of treatment failure. In: **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 188, n. 1, p. 69-76, jul. 2013.

PLOMGAARD, P.; FISCHER, C. P.; IBFELT, T.; PEDERSEN, B. K.; VAN HALL, G. Tumor necrosis factor-alpha modulates human in vivo lipolysis. In: **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, n. 2, p. 543-9, fev. 2008.

RANGEL-FRAUSTO, M. S.; PITTET, D.; COSTIGAN, M.; HWANG, T.; DAVIS, C. S.; WENZEL, R. P. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. In: **JAMA**, v. 273, n. 2, p. 117-23, jan. 1995.



REX, S.; BEAULIEU, L. M.; PERLMAN, D. H. et al. Immune versus thrombotic stimulation of platelets differentially regulates signalling pathways, intracellular protein-protein interactions, and alpha-granule release. In: **Thrombosis and Haemostasis**, v. 102, n. 1, p. 97-110, 2009.

RHODES, A.; WORT, S. J.; THOMAS, H.; COLLINSON, P.; BENNETT, E. D. Plasma DNA concentration as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients. In: **Critical Care**, v. 10, p. 60, 2006.

RIEDEMANN, N. C.; NEFF, T. A.; GUO, R. F.; BERNACKI, K. D.; LAUDES, I. J.; SARMA, J. V.; LAMBRIS, J. D.; WARD, P. A. Protective effects of IL-6 blockade in sepsis are linked to reduced C5a receptor expression. In: **Journal of Immunology**, v. 170, n. 1, p. 503-7, 2003.

ROSE-JOHN, S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. In: **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, p. 1237-47, 2012.

ROVIN, B. H. Chemokine blockade as a therapy for renal disease. In: **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 9, n. 3, p. 225-32, maio 2000. Review.

RUKAVINA, T.; VASILJEV, V.; TICAC, B. Proinflammatory cytokines in antilipopolysaccharide immunity against *Klebsiella* infections. In: **Mediators of Inflammation**, v. 2005, n. 2, p. 88-95, jun. 2005.

SCHORR, C. A.; ZANOTTI, S.; DELLINGER, R. P. Severe sepsis and septic shock: management and performance improvement. In: **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 190-9, jan. 2014. Review.

SCHORTGEN, F.; ASFAR, P. Update in sepsis and acute kidney injury 2014. In: **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 191, n. 11, p. 1226-31, jun. 2015.

SCHULTE, W.; BERNHAGEN, J.; BUCALA, R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets - an updated view. In: **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 165974, 2013. doi: 10.1155/2013/165974. Epub 2013 Jun 18. Review.

SEMPLE, J. W.; ITALIANO J. E. Jr.; FREEDMAN, J. Platelets and the immune continuum. In: **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 4, p. 264-74, abr. 2011.

SERBINA, N. V.; PAMER, E. G. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. In: **Nature Immunology**, v. 7, n. 3, p. 311-7, mar 2006.

SERPA NETO, A.; ASSUNÇÃO, M. S.; PARDINI, A.; SILVA, E. Feasibility of transitioning from APACHE II to SAPS III as prognostic model in a Brazilian general intensive care unit. A retrospective study. In: **Sao Paulo Medical Journal**, v. 133, n. 3, p. 199-205, maio-jun. 2015.

SHAHIN, R. D.; ENGBERG, I.; HAGBERG, L.; SVANBORG EDÉN, C. Neutrophil recruitment and bacterial clearance correlated with LPS responsiveness in local gram-negative infection. In: **Journal of Immunology**, v. 138, n. 10, p. 3475-80, maio 1987.

SHAVER, C. M.; HAUSER, A. R. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. In: **Infection and Immunity**, v. 72, n. 12, p. 6969-77, dez. 2004.

SHRUM, B.; ANANTHA, R. V.; XU, S. X.; DONNELLY, M.; HAERYFAR, S. M.; MCCORMICK, J. K.; MELE, T. A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. In: **BMC Research Notes**, v. 7, p. 233, abr. 2014.

SICA, A.; WANG, J. M.; COLOTTA, F.; DEJANA, E.; MANTOVANI, A.; OPPENHEIM, J. J.; LARSEN, C. G.; ZACHARIAE, C. O.; MATSUSHIMA, K. Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. In: **Journal of Immunology**, v. 144, n. 8, p. 3034-8, abr. 1990.

SILVA, E.; PEDRO MDE, A.; SOGAYAR, A. C.; MOHOVIC, T.; SILVA, C. L.; JANISZEWSKI, M.; CAL, R. G.; DE SOUSA, EF.; ABE, T. P.; DE ANDRADE, J.; DE MATOS, J. D.; REZENDE, E.; ASSUNÇÃO, M.; AVEZUM, A.; ROCHA, PC.; DE MATOS, G. F.; BENTO, A. M.; CORRÊA, A. D.; VIEIRA, P. C.; KNOBEL, E.; BRAZILIAN SEPSIS EPIDEMIOLOGICAL STUDY. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). In: **Critical Care**, v. 8, n. 4, p. 251-60, ago. 2014.

SINGBARTL, K.; BISHOP, J. V.; WEN, X.; MURUGAN, R.; CHANDRA, S.; FILIPPI, M. D.; KELLUM, J. A. Differential effects of kidney-lung cross-talk during acute kidney injury and bacterial pneumonia. In: **Kidney International**, v. 80, n. 6, p. 633-44, set. 2011.

SLEIGH, J.; CURSONS, R.; LA PINE, M. Detection of bacteraemia in critically ill patients using 16S rDNA polymerase chain reaction and DNA sequencing. In: **Intensive Care Medicine**, v. 27, p. 1269-73, 2001.

SOARES, A. C.; SOUZA, D. G.; PINHO, V.; VIEIRA, A. T.; NICOLI, J. R.; CUNHA, F. Q.; MANTOVANI, A.; REIS, L. F.; DIAS, A. A.; TEIXEIRA, M. M. Dual function of the long pentraxin PTX3 in resistance against pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae* in transgenic mice. In: **Microbes and Infection**, v. 8, n. 5, p. 1321-9, abr. 2006.

SORDI, R.; MENEZES-DE-LIMA, O.; DELLA-JUSTINA, A. M.; REZENDE, E.; ASSREUY, J. Pneumonia-induced sepsis in mice: temporal study of inflammatory and cardiovascular parameters. In: **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 94, n. 2, p. 144-55, abr. 2013.

STERNBERG, E. M. Neural-immune interactions in health and disease. In: **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 11, p. 2641-7, dez. 1997. Review.

STRIZ, I.; BRABCOVA, E.; KOLESAR, L.; SEKERKOVA, A. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. In: **Clinical Science**, v. 126, n. 9, p. 593-612, 2014.

SVANBORG, C.; GODALY, G.; HEDLUND, M. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. In: **Current Opinion Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 99-105, fev. 1999. Review. PubMed PMID: 10047563.

TANG, D.; KANG, R.; COYNE, C. B.; ZEH, H. J.; LOTZE, M. T. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. In: **Immunology**, v. 249, n. 1, p. 158-75. 2012. Review.

TELES, J. M.; SILVA, E.; WESTPHAL, G.; FILHO, R. C.; MACHADO, F. R. Surviving sepsis campaign in Brazil. In: **Shock**, v. 30 Suppl 1, p. 47-52, out 2008. Review.

TEN OEVER, J.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J.; VAN DE VEERDONK, F. L.; STELMA, F. F.; SIMON, A. et al. Circulating galectin-3 in infections and non-infectious inflammatory diseases. In: **European Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 1605-1610, 2013.

THURMAN, J. M.; LENDERINK, A. M.; ROYER, P. A.; COLEMAN, K. E.; ZHOU, J.; LAMBRIS, J. D.; NEMENOFF, R. A.; QUIGG, R. J.; HOLERS, V. M. C3a is required for the production of CXC chemokines by tubular epithelial cells after renal ischemia/reperfusion. In: **Journal of Immunology**, v. 178, n. 3, p. 1819-28, fev. 2007.

TITTEL, A. P.; HEUSER, C.; OHLIGER, C.; LLANTO, C.; YONA, S.; HÄMMERLING, G. J.; ENGEL, D. R.; GARBI, N.; KURTS, C. Functionally relevant neutrophilia in CD11c diphtheria toxin receptor transgenic mice. In: **Nature Methods**, v. 9, n. 4, p. 385-90, fev. 2012.

TRACEY, K. J.; FONG, Y.; HESSE, D. G.; MANOGUE, K. R.; LEE, A. T. et al. Anticachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. In: **Nature**, v. 330, p. 662-4, 1987.

TSIOTOU, A. G.; SAKORAFAS, G. H.; ANAGNOSTOPOULOS, G.; BRAMIS, J. Septic shock: current pathogenetic concepts from a clinical perspective. In: **Medical Science Monitor**, v. 11, n. 3, p. 76-85, mar 2005. Review.

VAN DEN BERG, S.; LAMAN, J. D.; BOON, L.; TEN KATE, M. T.; DE KNEGT, G. J.; VERDIJK, R. M.; VERBRUGH, H. A.; NOUWEN, J. L.; BAKKER-WOUDENBERG, I. A. Distinctive cytokines as biomarkers predicting fatal outcome of severe *Staphylococcus aureus* bacteremia in mice. In: **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. 59107, 2013.

VAN DER WINDT, G. J.; BLOK, D. C.; HOOGERWERF, J. J.; LAMMERS, A. J.; DE VOS, A. F.; VAN'T VEER, C.; FLORQUIN, S.; KOBAYASHI, K. S.; FLAVELL, R. A.; VAN DER POLL, T. Interleukin 1 receptor-associated kinase m impairs host defense during pneumococcal pneumonia. In: **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 12, p. 1849-57, jun. 2012.

VILLA, P.; SARTOR, G.; ANGELINI, M.; SIRONI, M.; CONNI, M.; GNOCCHI, P.; ISETTA, A. M.; GRAU, G.; BUURMAN, W.; VAN TITS, L. J. et al. Pattern of cytokines and pharmacomodulation in sepsis induced by cecal ligation and puncture compared with that induced by endotoxin. In: **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 2, n. 5, p. 549-53, 1995.

VINCENT, J. L.; FERREIRA, FL; EVANS, TW.; FINK, M. P. Multiple organ failure: clinical syndrome. Mechanisms of Organ Dysfunction in Critical Illness. In: **Intensive Care Medicine Springer** – Verlag Berlin Heidelberg, v. 394- 403, 2002

VINCENT, J. L.; MORENO, R.; TAKALA, J.; WILLATTS, S.; DE MENDONÇA, A.; BRUINING, H.; REINHART, C. K.; SUTER, P. M.; THIJIS, L. G. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. In: **Intensive Care Medicine**, v. 22, n. 7, p. 707-10, jul. 1996.

VINCENT, J. L.; MORENO, R. Clinical review: scoring systems in the critically ill. In: **Critical Care**, v. 14, n. 2, p. 207, 2010. doi: 10.1186/cc8204. Epub 2010 Mar 26. Review.

VINCENT, J. L.; OPAL, S. M.; MARSHALL, J. C.; TRACEY, K. J. Sepsis definitions: time for change. In: **Lancet**, v. 381, n. 9868, p. 774-5, mar. 2013.

VINCENT, J. L.; YAGUSHI, A.; PRADIER, O. Platelet function in sepsis. In: **Critical Care Medicine**, v. 30, n. 5, p. 313-17, 2002.

VOVES, C.; WUILLEMIN, W. A.; ZEERLEDER, S. International Society on Thrombosis and Haemostasis score for overt disseminated intravascular coagulation predicts organ dysfunction and fatality in sepsis patients. In: **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 17, n. 6, p. 445-51, set. 2006.

WAAGE, A.; BRANDTZAEG, P.; HALSTENSEN, A.; KIERULF, P.; ESPEVIK, T. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. In: **Journal of Experimental Medicine**, v. 169, n. 1, p. 333-8, jan. 1989.

WAAGE, A.; ESPEVIK, T.; LAMVIK, J. Detection of tumour necrosis factor-like cytotoxicity in serum from patients with septicaemia but not from untreated cancer patients. In: **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 24, n. 6, p. 739-43, dez. 1986.

WALKER, F.; ZHANG, H. H.; MATTHEWS, V.; WEINSTOCK, J.; NICE, E. C.; ERNST, M.; ROSE-JOHN, S.; BURGESS, A. W. IL6/sIL6R complex contributes to emergency granulopoietic responses in G-CSF- and GM-CSF-deficient mice. In: **Blood**, v. 111, p. 3978-85, 2008.

WANG, H.; BLOOM, O.; ZHANG, M.; VISHNUBHAKAT, J. M.; OMBRELLINO, M. et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. In: **Science**, v. 285, p. 248–51, 1999.

WANG, X.; MURTHY, N. Bacterial imaging comes of age. In: **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 259, p. 259fs43, out. 2014.

WEN, L. L.; CHIU, C. T.; HUANG, Y. N.; CHANG, C. F.; WANG, J. Y. Rapid glia expression and release of proinflammatory cytokines in experimental *Klebsiella pneumoniae* meningoencephalitis. In: **Experimental Neurology**, v. 205, n. 1, p. 270-8, maio 2007.

WESTMAN, J.; SMEDS, E.; JOHANSSON, L.; MÖRGELIN, M.; OLIN, A. I.; MALMSTRÖM, E.; LINDER, A.; HERWALD, H. Treatment with p33 curtails morbidity and mortality in a histone-induced murine shock model. In: **Journal of Innate Immunology**, v. 6, p. 819-830, 2014.

WINWOOD, P. J.; ARTHUR, M. J. Kupffer cells: their activation and role in animal models of liver injury and human liver disease. In: **Seminars in Liver Disease**, v. 13, n. 1, p. 50-9, fev. 1993. Review.

WIPFLER, P.; PILZ, G.; LESICKY, O.; GOLASZEWSKI, S. M.; LADURNER, G.; KRAUS, J. *Klebsiella meningoencephalitis* presenting like embolic ischemic stroke. In: **Journal of Neurology**, v. 255, n. 12, p. 1983-4, dez. 2008.

WOLFE, D. N.; KARANIKAS, A. T.; HESTER, S. E.; KENNETT, M. J.; HARVILL, E. T. IL-10 induction by *Bordetella parapertussis* limits a protective IFN-gamma response. In: **Journal of Immunology**, v. 184, n. 3, p. 1392-400, fev. 2010.

XING, Z.; GAULDIE, J.; COX, G.; BAUMANN, H.; JORDANA, M.; LEI, X. F.; ACHONG, M. K. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. In: **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 2, p. 311-20, 1998.

YANG, S. C.; LIAO, K. M.; CHEN, C. W.; LIN, W. C. Positive blood culture is not associated with increased mortality in patients with sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. In: **Respirology**, v. 18, n. 8, p. 1210-6, nov. 2013.

YOSHIZAWA, K.; NARUTO, M.; IDA, N. Injection time of interleukin-6 determines fatal outcome in experimental endotoxin shock. In: **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 16, n. 12, p. 995-1000, 1996.

YODEN, W. J. Index for rating diagnostic tests. In: **Cancer**, v. 3, n. 1, p. 32-5, jan. 1950.

YSEBAERT, D. K.; DE GREEF, K. E.; VERCAUTEREN, S. R.; GHIELLI, M.; VERPOOTEN, G. A.; EYSKENS, E. J.; DE BROE, M. E. Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury. In: **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 15, n. 10, p. 1562-74, out. 2000.

ZHAO, H. Q.; LI, W. M.; LIU, Z. Q.; SHENG, Z. Y.; YAO, Y. M. The growing spectrum of anti-inflammatory interleukins and their potential roles in the development of sepsis. In: **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 35, n. 4, p. 242-51, abr. 2015.

ZHOU, X. L.; HUANG, L.; CAO, J. Embelin Reduces Systemic Inflammation and ameliorates organ injuries in septic rats through downregulating STAT3 and NF- $\kappa$ B pathways. In: **Inflammation**, v. 38, n. 4, p. 1556-62, ago. 2015.